

# **Atropins farmakologi, tarmens respons och kolik hos häst**

Plasmakoncentrationen av atropin och biomarkörer  
för tarmmotilitet

## **The pharmacology of atropine, the gastrointestinal response and colic in horses**

The plasma concentration of atropine and biomarkers for  
gastrointestinal motility

Anna Sundell

*Uppsala*  
*2020*





# **Atropins farmakologi, tarmens respons och kolik hos häst**

Plasmakoncentrationen atropin och biomarkörer för tarmmotilitet

## **The pharmacology of atropine, the gastrointestinal response and colic in horses**

The plasma concentration of atropine and biomarkers for gastrointestinal motility

*Anna Sundell*

**Handledare:** Carl Ekstrand, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Bitr. handledare:** Lena Ström, Institutionen för kliniska vetenskaper

**Examinator:** Eva Tyden, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

*Examensarbete i veterinärmedicin*

**Omfattning:** 30 hp

**Nivå och fördjupning:** Avancerad nivå, A2E

**Kurskod:** EX0869

**Kursansvarig institution:** Institutionen för kliniska vetenskaper

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2020

**Elektronisk publicering:** <https://stud.epsilon.slu.se>

**Omslagsillustration:** Fotografi taget av Lena Ström

**Nyckelord:** Atropin, PK/PD-modell, uveit, EIG, kolik

**Key words:** Atropine, PK/PD-model, uveitis, colic

**Sveriges lantbruksuniversitet**  
**Swedish University of Agricultural Sciences**

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap



## SAMMANFATTNING

Inflammation i ögats uvea, så kallad uveit, är en smärtsam och vanlig komplikation till olika sjukdomstillstånd i hästars ögon. Vid uveit uppstår en spasm i pupillen och i ciliarkroppen vilket är smärtsamt och komplikationer i form av sammanväxningar (så kallade synechier) mellan lins och iris kan leda till kvarstående synnedsättning eller blindhet. Atropin är ett antikolinergikum som relaxerar iris och ciliarmuskulaturen vilket minskar smärtan samt risken för synechier. Atropin är en antagonist på muskarinreceptorer som förutom i ögat återfinns bland annat i mag-tarmsystemet. Därför kan atropin ge nedsatt tarmmotilitet och kolik hos hästar både vid topikal och intravenös administrering beroende på vilken dos som administreras.

På grund av att atropin kan ge kolik har medfört en rädsla inför hur läkemedlet bör användas och sannolikt har en alltför restriktiv behandlingsnorm uppstått, där vissa veterinärer helt undviker atropin vid behandling av uveit (Ström, L., resident i oftalmologi vid Sveriges lantbruksuniversitet, pers. medd., 20191102). Syftet med detta examensarbete är att farmakologiskt utvärdera atropins förlopp med PK/PD-modellering och utvärdera metoderna elektointestinoграфи (EIG) samt auskultation av tarmljud för att hitta gränsvärden för vilken plasmakoncentration av atropin i blodet som ger nedsatt myoelektrisk aktivitet i tarmen.

Detta examensarbete bygger på en litteraturdela, som motiverar de metoder som använts, och en experimentell del. I den experimentella delen har 8 hästar deltagit i två omgångar där de ena omgången erhållit en konstantinfusion med atropinsulfat i 30 minuter och andra omgången natriumkloridlösning (kontroll) i en blindad och randomiserad cross-over design. Fyra av hästarna erhöi dosen atropinsulfat 9 µg/kg och fyra hästar 12 µg/kg. Observera att 1 µg atropinsulfat motsvarar 0,835 µg atropin. Under och efter infusionen mättes tarmens elektriska potential med EIG under tio timmar genom elektroder placerade på huden i området för caecum och colon. Dessutom auskultades tarmljuden med stetoskop och plasmakoncentrationerna med atropin mättes under tio timmar vid på förhand fastställda tidpunkter. Koliksymptom noterades och graderades från mild – svår utifrån särskilda kriterier. Farmakologiska data analyserades och användes för farmakologiska modeller i mjukvaran Monolix©Lixoft.

Samtliga hästar fick signifikant ( $p < 0,000 - 0,048$ ) nedsatta EIG-potentialer under försökets första 20 minuter – 3 timmar efter att infusionen med atropinsulfat startats. Detta korrelerade med tarmljuden som blev signifikant ( $p < 0,000 - 0,012$ ) nedsatta mellan försökets första 15 minuter och 2 timmar efter att infusionen startats. Sex hästar uppvisade milda koliksymptom (grad 1/6) någon gång under försökets första 29 – 75 minuter efter att de erhållit atropinsulfat, koliksymptom noterades även hos en häst efter att den erhållit natriumkloridlösning. Efter modellering i mjukvaran Monolix©Lixoft uppskattades att maximala hämningen ( $I_{max}$ ) av EIG-potentialen i caecum var 55,8 % och halva hämningen ( $IC_{50}$ ) uppnåddes vid plasmakoncentrationen 0,343 µg/L. I colon var  $I_{max}$  66,7 % och  $IC_{50}$  0,59 µg/L.

Dessa experiment bekräftar att resultaten korrelerar väl vid mätning av EIG jämfört med när tarmljuden observeras med stetoskop. Dessutom visade hästarna endast milda koliksymptom, trots att de fick höga doser atropin jämfört med de doser som används kliniskt. Hur olika koncentrationer atropin påverkar tarmens elektriska potential kartlades och den doseringsregim med atropin som används i dagsläget vid behandling av uveit bedöms inte kunna ge upphov till kolik.

## SUMMARY

Inflammation in the uvea, so called uveitis, is a painful and common complication to various pathological events in the horse eye. Uveitis causes a spasm in the pupil and ciliary body of the eye which is painful and complications as adhesions (so called synechiae) between the lens and the iris can cause permanent loss of vision or blindness. Atropine is an anticholinergic drug that relax the iris and ciliary body which reduce pain and the risk for synechiae. Atropine is an antagonist on muscarinic receptors which can be found in the eye and in the gastrointestinal tract. Hence atropine can reduce gastro intestinal motility and cause colic in horses after either topical or intravenous administration, depending on the dose.

The fact that atropine can cause colic has led to uncertainty if the drug should be used and a treatment standard that is probably too restricted has arisen, where some veterinarians exclude atropine when treating uveitis (Ström, L., resident in ophthalmology at Swedish University of Agricultural Sciences, pers. medd., 20191102). The aim of this thesis is to evaluate the pharmacology of atropine in the body of the horse with PK/PD-modelling, evaluate the methods electrointestinography (EIG) and auscultation of intestinal sounds in order to find limits of plasma concentration of atropine that lower the myoelectric activity in the intestine.

This thesis is based on a literature study that motivates the methods used and an on experiments. In the experiments 8 horses participated in two sets. In one set the horses received a constant infusion with atropine sulfate for 30 minutes and in the other set sodium chloride (control group) in a blinded randomized cross-over design. Four of the horses received atropine sulphate in a dose of 9 µg/kg and four of the horses received 12 µg/kg. Note that 1 µg atropine sulphate is equal to 0.835 µg atropine. During and after the infusion the gastrointestinal myoelectrical potentials were measured with the EIG method for ten hours using electrodes placed on the skin in the area of caecum and colon. The gastrointestinal sounds were auscultated with a stethoscope and the plasma concentration of atropine was measured during ten hours at specific times that were planned in beforehand. Symptoms of colic were noted and graded from mild to severe based on particular criteria. The pharmacological data were analyzed and used in pharmacological modelling in the software Monolix©Lixoft.

All horses had a significant ( $p < 0,000 - 0,048$ ) decrease of EIG potentials during the first 20 minutes to 3 hours after the start of the atropine sulphate infusion. This was correlating well with the intestinal sounds that were significantly ( $p < 0,000 - 0,012$ ) decreased during the first 15 minutes to 2 hours after start of infusion. Six horses showed mild signs of colic (grade 1/6) some occasion during the first 29 – 75 minutes after the infusion started. Mild signs of colic were noted in one horse after receiving sodium chloride infusion. After establishing a pharmacological model in the software Monolix©Lixoft the maximal inhibition ( $I_{max}$ ) of the EIG potential in caecum was 55,8% and half of the inhibition effect ( $IC_{50}$ ) was achieved at the plasma concentration 0,343 µg/L. In colon the  $I_{max}$  was 66,7% and the  $IC_{50}$  was 0,59 µg/L.

These experiments confirm that the results correlate when using EIG compared to auscultation intestinal sounds with stethoscope. The horses only showed mild signs of colic although the received relatively high doses of atropine sulphate. The response of the myoelectrical potentials in the intestines due to different plasma concentrations of atropine were plotted and the current dosage of atropine when treating uveitis does not seem to be a possible cause of colic in horses.

# INNEHÅLL

INTRODUKTION .....	1
LITTERATURÖVERSIKT .....	2
HÄSTÖGAT .....	2
TARMEN .....	4
FARMAKOKINETIK .....	6
FARMAKODYNAMIK .....	8
ATROPIN .....	9
ANVÄNDNING AV ELEKTROINTESTINOGRAFI (EIG) TILL HÄST .....	11
FARMAKOLOGISK MODELLERING I MJUKVARAN MONOLIX©LIXOFT .....	13
MATERIAL OCH METODER .....	14
EXPERIMENTELLA STUDIER .....	14
FARMAKOKINETISK/FARMAKODYNAMISK (PK/PD) ANALYS .....	17
STATISTIK .....	18
RESULTAT .....	18
PLASMAEXPONERING AV ATROPIN .....	18
BIOMARKÖRER ÖVER TID .....	19
FARMAKOKINETISK MODELLERING .....	22
FARMAKODYNAMISK MODELLERING .....	23
DISKUSSION .....	26
PLASMAEXPONERING AV ATROPIN .....	26
BIOMARKÖRER ÖVER TID .....	26
FARMAKODYNAMISK/FARMAKOKINETISK MODELLERING .....	28
KLINISK RELEVANS .....	29
KONKLUSION .....	31
TACK .....	31
POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING .....	32
REFERENSER .....	34





## INTRODUKTION

Uveit är inflammation i ögats druvhinna. Detta är en smärtsam och vanlig komplikation till flera olika sjukdomstillstånd i hästens öga - bland annat trauma, systemiska sjukdomar och infektioner med virus, bakterier eller parasiter. En komplikation till uveit är att pupillen krampaktigt kontraherar vilket bidrar till smärta i ögat och kan leda till kvarstående komplikationer såsom sammanväxningar mellan lins och iris samt nedsatt syn eller blindhet i framtiden. En viktig behandling vid uveit är atropin, som genom att vidga pupillen både minskar smärtan i ögat och minskar risken för komplikationer i form av synechier (Gilger, 2017; Schwink, 1992).

Atropin är ett antikolinergikum som är en antagonist på muskarinreceptorer i ögat, vilket vidgar pupillen. Muskarinreceptorer finns inte bara i ögat utan även bland annat i hästens mag-tarmsystem vilket gör att atropin har bieffekter (Menozzi *et al.*, 2017; Schwink, 1992). Atropin kan ge nedsatt tarmmotilitet både vid intravenös administrering (Adams *et al.*, 1984; Ducharme & Fubini, 1983) och vid topikal administrering i ögat med kort dosintervall (Williams *et al.*, 2000). I studien av Williams *et al.* (2000) administrerades 1 mg atropinsulfat (varav 0,835 mg atropin) varje timma i 24 timmar men även vid 3 timmars dosintervall påverkas tarmmotiliteten (Ström L., 2014).

Eftersom atropin kan ge kolik har medfört en rädsla inför hur läkemedlet bör användas och sannolikt har en alltför restriktiv behandlingsnorm uppstått, där vissa veterinärer helt undviker atropin vid behandling av uveit (Ström, L., resident i oftalmologi vid Sveriges lantbruksuniversitet, pers. medd., 20191102). Detta blir ett djurvälståndproblem då uveit är mycket smärtsamt och kan leda till svåra komplikationer som nedsatt eller förlorad syn på ögat. Detta examensarbete består av en litteraturgenomgång som redovisar redan känd kunskap och klargör vilka kunskapsluckor som finns, vilka motiverar de metoder som använts, samt en experimentell del. Den experimentella delen består av resultaten från de kliniska experiment där effekterna av atropin har utvärderats efter intravenös administrering, i en blindad och randomiserad cross-over design, där resultaten har använts för farmakologisk modellering i mjukvaran Monolix©Lixoft. Syftet med detta examensarbete är att utvärdera farmakologiska data tillsammans med mätningar av tarmens myoelektriska aktivitet för att hitta gränsvärden för vilken plasmakoncentration av atropin i blodet som ger nedsatt aktivitet i tarmen. Ett sekundärt mål var att utvärdera auskultation av tarmljud och elektointestinografi (EIG) som biomarkörer för tarmmotilitet. Frågeställningarna var: Vilket samband finns mellan plasmakoncentrationerna av atropin och tarmens motilitet utvärderat med elektointestinografi (EIG)? Finns det en samstämmighet mellan EIG-potentialerna och den kliniskt etablerade variabeln med auskulterade tarmljud?

## LITTERATURÖVERSIKT

### Hästögat

#### ***Anatomi, fysiologi, funktion***

Hästens öga består av ögongloben, som omges av benen i orbitan och övre, undre samt tredje ögonlocket. Hästens ögonglob är sfäroid med den största diametern dorsalt-ventralt (Lavach, 1987).

Konjunktivan sträcker sig från insidan på ögonlocken och fäster via fornix till ögongloben. I konjunktiva finns bägarceller som producerar mucin, det inre lagret av tårfilmen som binder till epitelet på ögats yta. Tårfilmen finns på ögats yta och den består av tre lager. Dorsalt i orbitan, ovanför tinningbenet, finns tårkörtelvävnad som står för en stor del av den vattenbaserade delen av tårfilmen, som är mellanlagret. Runt basen på det tredje ögonlocket finns körtelvävnad som också bidrar till den vattenbaserade delen av tårfilmen. Det tredje och yttre lagret, som är lipid-baserat och detta produceras av Meibomska körtlar vars mynningar sitter i ögonlockskanten. Nästa lager av ögats yta, under tårfilmen, finns cornea - det transparenta epitellagret som täcker ögats yta. Cornea består av fem lager hos häst: okeratiniserat skivepitel ytterst mot omvärlden, basalmembran, stroma och descemts membran som är basalcellslager för endotelet vilket är det djupaste lagret. Cornea övergår vid limbus till sclera vilket är den vita fibrösa vävnad som omger ögongloben (Gelatt & Plummer, 2017; Dyce *et al.*, 2010; Cooley, 1992).

Ögongloben består av två rum: Främre och bakre kammaren vilka separeras av linsen och ciliarkroppen. Ciliarkroppen håller linsen på plats med tunna cilier som utgår från ciliarkroppen och fäster in på linsen. Ciliarkroppen är en del av uvea (druvhinnan). Uvea är ett samlingsnamn för tre anatomiska strukturer: Iris, corioidea och ciliarkroppen (Gelatt & Plummer, 2017).

Iris är en kraftigt pigmenterad struktur som utgår från ciliarkroppen. Dess funktion är att ändra pupillens storlek och reglera ljusinsläppet på liknande sätt som slutaren i en kamera. Iris består av tre lager: ett främre gränslager, sedan stroma och sist det pigmenterade epitelet. Det främre lagret innehåller fibroblaster och melanocyter medan stromat innehåller fibroblaster, kollagen-fibrer, blodkärl och kromatoforer samt sfinktermuskulaturen som är parasympatiskt innerverad. Bakom stromat finns dilatormuskeln som är sympatiskt innerverad och bakom denna finns ett dubbelt lager med pigmenterade epitelceller. Hos hästar finns även så kallade *corpora nigra* eller *granula iridica*, cystiska utbuktningar som utgår från den dorsala kanten av pupillen. Ciliarkroppen producerar den vattenbaserade vätska som finns i ögats främre och bakre kammare. Det intraoculära trycket regleras genom att vätska dräneras och blandas med blodet i den iridocorneala vinkeln. Vätskan produceras dels genom att ciliarkroppen ultrafiltrerar plasma och dels genom aktiv sekretion. Den bakre aspekten av ciliarkroppen har direktkontakt med glaskroppen (se nedan) och här utlinjeras ciliarkroppen av ett tvåradigt epitellager där det lagret som ligger mot ciliarkroppen är pigmenterat och under detta finns ett opigmenterat lager. Cellerna i det opigmenterade epitellagret binds samman av så kallade tight junctions som tros stå för den så kallade blod-ögonbarriären där proteiner och celler från blodet filtreras bort. Vätskans funktion är att förse lins och cornea, som båda är icke-blodförsörjda strukturer, med näringsämnen och att avlägsna restprodukter (Gelatt & Plummer, 2017; Gilger, 2017; Cooley, 1992).

Choroidea täcker insidan på scleran och i denna vävnad finns en stor mängd kärl som utgår med ursprung från den punkt där synnerven lämnar ögonbotten (optiska disken) och dess uppgift är att försörja näthinnan. Choroidea hos hästar är kraftigt pigmenterad men har ett område som kallas *tapetum* som är reflekterar ljus och gör att ögat lättare uppfattar ljus i dämpade ljusförhållanden. Linsen sitter bakom iris och är oval, genomskinlig struktur som fokuserar ljuset som kommer in i ögat till retinan. Denna hålls fast med zonula-fibrer som utgår från ciliarkroppen och fäster i linsen (Gelatt & Plummer, 2017; Gilger, 2017).

Bakom linsen, i ögats bakre kammare, finns glaskroppen som är en gelatinös vätska vilken hjälper ögat att upprätthålla sin runda form. Fundus (ögonbotten) finns längst in i ögat och utgörs av retina (näthinnan), synnerven och choroidea. Retina innehåller fotoreceptorer – celler som är känsliga för ljus. Förenklat för dessa över information till synnerven som i sin tur skickar impulser till hjärnan (Gelatt & Plummer, 2017; Cooley, 1992).

### **Uveit**

Inflammation i uvea kallas uveit. Om inflammationen involverar iris och ciliarkropp påverkas främre kammaren och detta kallas för främre uveit. Om inflammationen involverar choroidea påverkas bakre kammaren och då kallas det för bakre uveit. Hos hästar kan främre och bakre uveit förekomma separat eller samtidigt (panuveit). Uveit är en vanlig komplikation till diverse ögonsjukdomar hos hästar. Etiologier är bland annat bakterie-, virus- eller parasitinfektioner i ögats vävnader och traumatiska sår på hornhinnan. Hos hästar är immunologiska orsaker till uveit relativt vanligt. Till exempel är equine recurrent uveitis (ERU) en immunmedierad sjukdom som är en av de vanligaste orsakerna till blindhet hos hästar. Dessa exempel på etiologier har gemensamt att blod-ögonbarriären störs genom direkt eller indirekt skada på dess celler, så att molekyler eller celler läcker in i ögat. När uvea skadas frisätts inflammatoriska mediatorer så som prostaglandiner, leukotriener och histaminer (Gilger, 2017; Schwink, 1992).

Symptomen på uveit kan skilja sig beroende på om det är en främre, bakre eller panuveit. Vid främre uveit ses akuta symptom med ökad ljuskänslighet och smärtsymptom så som blefarospasm, enoftalmi och mios. Cornea och iris kan bli ödematösa och vätskan i främre kammaren kan bli dimmig. Även konjunktiva kan påverkas av inflammationen och bli hyperemisk. Vid bakre uveit är yttre symptomen oftast inte lika markanta men det kan trots det vara kraftig inflammation i bakre delen av ögat och ses framförallt som grumlig av glaskroppen och inflammatoriska förändringar i näthinna och choroidea, vid oftalmologisk undersökning (Gilger, 2017; Schwink, 1992).

Uveit är ett allvarlig tillstånd vilket kan ge partiell eller fullständig blindhet. En viktig komplikation i samband med uveit är mios orsakad av spasm i sfinktermuskulaturen vilket kan orsaka sammanväxningar – synechier – mellan linsen och iris. Detta kan medföra att hästen inte kan reglera ljusintaget till ögat då linsen ej är rörlig och det finns även en risk för sekundärt glaukom då kammarvätskan på grund av synechier och inflammatoriskt debris hindras från att elimineras i iridocordeala vinkeln och det uveosclerala utflödet. Detta gör att det intraoculära trycket stiger. Andra komplikationer är katarrakt, fibros i iris, ödem i cornea, nedbrytning av

glaskropp och sänkt tryck i ögat (Gilger, 2017; Wilkie & Gilger, 2004; Mughannam *et al.*, 1999).

Behandling av uveit sker via både lokal (topikal) administration i ögat/ögonen och genom systemisk exponering av läkemedel. Enligt Riktlinjer för användning av antibiotika inom hästsjukvård (SVS, 2013) ska uveit behandlas topikalt med muskarinreceptorantagonister (till exempel atropin) och antiinflammatorisk behandling (till exempel glukokortikoider) samt systemisk antiinflammatorisk behandling med ”non steroid anti inflammatory drug” (NSAID). Vid tecken på bakteriell infektion i ögat och/eller vid skadad hornhinna undviks topikal antiinflammatorisk behandling och antibiotika sätts in. Systemisk antibiotika sätts in om hästen har tecken på systemisk infektion eller annan sjukdom som motiverar detta (Gilger, 2017; SVS, 2013).

Atropin är vanligt vid behandling av uveit hos häst och det används för att häva spasmen i pupillen och ciliarmuskulaturen. Detta minskar smärtan från ögat och vid god effekt – en maximalt dilaterad pupill – minskar risken för synechier mellan lins och iris. Om pupillen inte dilaterar trots behandling med atropin kan fenylefrin användas. Dock kan det vara omöjligt att få en maxdilaterad pupill om synechier har bildats men hästen kan ändå uppleva smärtlindring då spasmen i ciliarmuskulaturen släpper (Mughannam *et al.*, 1999; Schwink, 1992).

## **Tarmen**

### ***Anatomi, fysiologi, funktion***

Hästar är enkelmagade djur som använder grovtarmen som jäskammare där bakterier bryter ned cellulosan. Grovtarmen och caecum är därför proportionerligt betydligt större än hos många av de andra husdjuren. Caecum hos häst är ca 1 meter lång och har en volym på ca 40 liter. Colon ascendens har en volym på ca 100 liter. Colon ascendens har fyra colon-lägen börjar ventralt på hästens högra sida efter caecum med första colonläget (colon ventralis dexter) och sedan följer flexura sternalis, andra colonläget (colon ventralis sinister), flexura pelvina, tredje colonläget (colon dorsalis sinister), flexura diaphragmatica och fjärde colonläget (colon dorsalis dexter). Efter dessa kommer en kort colon transversum och sedan colon descendens, som hos häst kallas ”lilla colon”, vilken är flera meter lång och vindlande. Slutligen kommer rectum (Blikslager, 2017; Sjaastad *et al.*, 2016).

Den allmänna uppbyggnaden av tarmväggen hos däggdjur är mucosa närmast lumen, sedan submucosa, muscularis och serosa. Muscularis-lagret består av glatt muskulatur och är uppdelat i två delar – ett yttre longitudinellt muskellager och ett inre cirkulärt muskellager, det inre uppdelat i tjockt yttre lamellager och tunt inre lamellager, vilka samarbetar för att få den peristaltik som flyttar födan genom tarmen. I hästens tunntarm finns longitudinella muskellager kontinuerligt i tarmväggen medan i grovtarmen är muskelfibrerna samlade i *taenier* - longitudinellt orienterade muskelband. Grovtarmens peristaltik hos häst är utformad för en relativt långsam passage jämfört med magsäck och tunntarm. En serie samverkande kontraktioner i caecum förflyttar gas och ingesta från apex till colon. Vid ostiet flyttas dock en del av ingestan tillbaka till caecum, vilket fördröjer passagen. Vid flexura pelvina fördröjs ingestan ytterligare. I colon ascendens finns även motilitetsmönster som ger lokala

blandningsrörelser mellan haustrarna och koordinerade retrograda kontraktioner vilka fördröjer passagen ytterligare. Efter colon ascendens, genom colon descendens, är passagen snabbare och där formas träckbollarna. I colon descendens utsöndras stora mängder mucus för att träckbollarna lättare ska passera colon descendens och rectum. (Blikslager, 2017; Sjaastad *et al.*, 2016; Castro, 1993).

Grovtarmen hos häst har flera funktioner. Dels absorberar grovtarmen stora mängder vätska och elektrolyter. Grovtarmen fungerar också som jäskammare åt bakterier som och syntetiserar vitaminer och spjälkar cellulosa till fria fettsyror (volatile fatty acids, VFA), som är en viktig energikälla för hästen. Dessa funktioner möjliggörs av den komplexa motiliteten, vilken är känslig för störningar. Musklerna i tarmväggen styrs i huvudsak via det enteriska nervsystemet (ENS) med reflexer från ganglier i tarmens muskellager och submucosa, utan påverkan från hjärna och ryggmärg. Dock finns det även neuron i ENS som styrs av centrala nervsystemet (CNS) och immunsystemet. I ENS finns excitatoriska neuron som innehåller neurotransmittorer som acetylcholin, substans P och neurokinin A. De inhibitoriska neuronerna i ENS har andra neurotransmittorer, som är anti-adregena och anti-kolinergiska substanser. Excitatoriska och inhibitoriska neuron samverkar för att driva fram ingestan (Blikslager, 2017; Castro, 1993).

Den myoelektriska aktiviteten i tarmväggen kan mätas och på så sätt kan tarmens motilitet uppskattas. Den myoelektriska aktiviteten i tarmväggens glattmuskulatur består av långsamma vågor och aktionspotentialer. De långsamma vågorna ger tarmens elektiska potential en grundrytm genom att ge oscillationer i glattmuskulaturens membranpotential. Hur snabb frekvensen är varierar mellan olika delar av mag-tarmkanalen, den är snabbare i duodenum och blir långsammare i ileum. De långsamma avgör både i vilken riktning tarmens rörelser fortplantar sig och den maximala frekvensen av aktionspotentialer och därav kontraktioner. Aktionspotentialer styr tarmens kontraktioner och de triggas om något orsakar att tröskeln för snabb depolarisation av glattmuskelcellerna sänks. Varje långsam våg ger alltså inte en aktionspotential, utan något måste trigga utlösandet av aktionspotentialen. Tröskeln kan sänkas genom att musklerna mekaniskt sträcks ut, neurogena stimuli och hormonpåverkan vilket leder till en kontraktion. Moduleringen av kontraktionerna styrs bland annat av vagusnerven och sympatiska nervsystemet samt av ENS. De långsamma vågorna och aktionspotentialerna i magsäcken och tunntarmen ger ett mönster i den myoelektriska aktiviteten som kallas migrerande motorkomplex (migrating motor complex, MMC). Dessa beskrivs som tre faser där fas I innebär endast långsamma vågor och inga aktionspotentialer, fas II innebär aktionspotentialer på vissa av de långsamma vågorna samt fas III som innebär aktionspotentialer på samtliga långsamma vågor. Hästar har konstant en aktivitet med MMC i magsäcken och tunntarmen, oavsett när de senast ätit, till skillnad från andra djurslag där den myoelektriska aktiviteten varierar betydligt mer (Blikslager, 2017; Koenig & Cote, 2006).

Den myoelektriska aktiviteten i caecum och colon liknar den i magsäcken och tunntarmen med långsamma vågor och aktionspotentialer, dock skiljer sig mönstret när aktionspotentialerna kommer. När ileum går in i MMC fas III följs 72 % av dessa av myoelektrisk aktivitet i caecum, vilket tros vara en koppling mellan ileum och caecum för att förenkla passagen av ingesta (Koenig & Cote, 2006; Navarre & Roussel, 1996; Ross, 1990). I caecum har aktiviteten blivit uppmätt med hjälp av tryckmätningssystem som blivit fäst invasivt på caecums serosa (Sasaki

& Yoshihara, 1999) och med elektroder som opererats fast som implantat på ileum, caecum och flexura pelvina (Koenig & Cote, 2006; Ross, 1990). Resultaten från dessa studier har visat att det finns ett koordinerat motilitetsmönster i caecum som kallas ”cecal myoelectric complex”. Dels finns en frekvent aktivitet med låg amplitud som kopplas samman till blandningen av ingestan genom kontraktioner från haustra till haustra. Koordinerade toppar av aktivitet när caecum tömmer sig har också uppmätts. Dessa motilitetsmönster tros komma från en lokal pacemaker i caecumkroppen (Koenig & Cote, 2006; Sasaki & Yoshihara, 1999; Ross, 1990).

### **Kolik**

Kolik innefattar all smärta från buken, vilken ofta kommer från mag-tarmkanalen men i vissa fall även härrör från andra bukorgan. Oftast orsakas smärta i mag-tarmkanalen av förändringar i dess motilitet vilket kan leda till ileus. Ileus hos hästar är ett allvarligt, ibland dödligt, tillstånd där den framåtdrivande peristaltiken upphör. När sympatikus stimuleras hos hästar kan risken för ileus öka då motiliteten i jejunum sänks. Hastigt foderbyte är en annan riskfaktor, då det kan störa tarmfloran i grovtarmen kan ge ökad gasproduktion vilket kan orsaka fellägen. Uppstallning en stor del av dygnet är en annan riskfaktor – hästar som är uppstallade 19 – 24 timmar per dag löper ökad risk för kolik (Blikslager, 2017; Constable, 2017; Koenig & Cote, 2006; Cohen *et al.*, 1995).

Ileus kan bland annat orsakas av obstruktion av flödet genom hinder i tarmlumen eller strangulation av tarmen. Obstruktion av tarmen uppstår när ingesta eller främmande material packas och blockerar flödet. Strangulation av tarmen förhindrar också passagen av ingestan och blodflödet till tarmen, men obstruktionen av blodflödet är snabbare och av större grad initialt. Detta ger ett ökat tryck i vävnaderna och kan leda till ischemi och skada på tarmens mucosa. Hästar kan drabbas av flera allvarliga systemiska komplikationer vid ileus, så som chock, elektrolytrubbningar, endotoxinemi med flera (Blikslager, 2017; Koenig & Cote, 2006).

### **Farmakokinetik**

Principerna för farmakokinetik (PK) är absorption, distribution, metabolism och exkretion (ADME) och dessa beskriver hur ett läkemedel omsätts i kroppen över tid. Hur ett läkemedel administreras kan ha påverkan på plasmaexponeringen. Om läkemedlet administreras på annat sätt än intravenöst kan absorptionsfasen orsaka en fördröjning, innan läkemedlet blir systemiskt tillgängligt och kan utöva sin verkan. Vid extravasal administrering kommer vanligen inte allt läkemedel tas upp till blodet, till exempel i tarmen följer en del av läkemedlet med avföringen ut från individen. Efter oral administration tas läkemedlet upp via tarmen och kan passera levern, där det eventuellt metaboliseras (första passage-metabolism) innan det blir systemiskt tillgängligt. Metabolismen kan inaktivera en biologiskt aktiv substans eller ge upphov till en farmakologiskt aktiv metabolit. Metabolismen kan också ändra strukturen på en substans så att den blir hydrofil och därmed blir utsöndrad i urinen via njurarna. Levern kan även utsöndra en del av läkemedlet via gallan. Vid parenteral administrering absorberas läkemedlet till blodet utan att först passera levern. Hur stor andel av läkemedlet som tas upp till blodet vid extravasal administrering benämns läkemedlets biotillgänglighet, *F*. Molekyler som är små och oladdade absorberas mest effektivt och därför bör läkemedlet ha ett pH som är så likt den vävnad där det

absorberas som möjligt (Rang *et al.*, 2016; Fan & de Lannoy, 2014; Toutain & Bousquet-Mélou, 2004c).

Läkemedels egenskaper och kapaciteten i en individs olika organ avgör vilken takt ett läkemedel elimineras från kroppen. Volymen plasma, serum eller blod (beroende på vad som mäts) som totalt renas från läkemedlet varje tidsenhet benämns "clearance" ( $Cl$ ):

$$Cl = \frac{Dos}{AUC} \quad (1)$$

$Cl$  styrs av metabolismen och elimineringen i alla enskilda organ men lever och njurar är centrala i denna process.  $Cl$  påverkas av blodflödet genom de eliminerande organen och antalet metaboliserande enzym. Eliminationen är en viktig parameter då det avgör hur mycket och hur länge som kroppen exponeras för läkemedlet.  $Cl$  är en av de tre komponenterna som används för att bestämma doseringstakten av ett läkemedel:

$$Dosering = \frac{Cl * terapeutisk \text{ plasmakoncentration}}{\text{biotillgänglighet}} \quad (2)$$

Den terapeutiska plasmakoncentrationen är den koncentration av läkemedlet som bör finnas i plasma för att läkemedlet ska kunna utöva den önskade responsen (Rang *et al.*, 2016; Fan & de Lannoy, 2014; Toutain & Bousquet-Mélou, 2004a).

Hur hög plasmakoncentrationen som uppnås efter administrering av ett läkemedel beror på hur läkemedlet distribueras i kroppen. Ett läkemedels distributionsvolym,  $V_d$ , avgörs av hur mycket läkemedel som totalt finns i kroppen i förhållande till plasmakoncentrationen:

$$V_d = \frac{\text{Mängd läkemedel i kroppen vid viss tidpunkt}}{\text{Plasmakoncentration vid viss tidpunkt}} \quad (3)$$

Fysiologiskt styrs  $V_d$  av hur stor andel av läkemedlet som binds till plasmaproteiner och till olika vävnader. Den andel av läkemedlet som är bundet är inte tillgänglig för att utöva sin effekt på målorganet. Läkemedel elimineras också i olika takt från olika vävnader, vilket gör att takten för eliminering av läkemedel kan förändras över tid. I en funktion för koncentration i blodet över tid ses detta som olika "kompartments" där lutningen på kurvan kommer skilja sig vid olika tidpunkter beroende på vilka vävnader som läkemedlet i huvudsak elimineras från vid den tidpunkten (Rang *et al.*, 2016; Fan & de Lannoy, 2014; Toutain & Bousquet-Mélou, 2004c).

Den totala exponeringen av ett läkemedel från ett läkemedlet administrerats till att det blivit eliminerat från kroppen, uppskattas genom beräkning av arean under kurvan, AUC ("area under curve"), för koncentration i blodet över tid. Värdet på AUC bestäms av dosen och  $Cl$  men påverkas av  $V_d$ . Om  $V_d$  för läkemedlet är hög måste en högre dos administreras för att upprätthålla en terapeutisk plasmakoncentration och då blir exponeringen för läkemedlet, AUC, också högre (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004c).

När ett läkemedel administreras till kroppen intravenöst under relativt kort tid kommer plasmakoncentrationen initialt sjunka i en förhållandevis hög takt efter att den högsta koncentrationen,  $C_{max}$ , uppnåtts då en del av läkemedlet distribueras till olika vävnader samtidigt som en del av det elimineras från kroppen via lever och njurar. När läkemedlet har distribuerats sjunker plasmakoncentrationen endast på grund av endast elimineringen från kroppen vilket kallas "pseudo-equilibrium" och då kommer plasmakoncentrationen sjunka i en långsammare takt. Den terminala halveringstiden,  $T_{1/2}$ , för ett läkemedel är den tid det tar för halva mängden läkemedel att elimineras efter att pseudo-equilibrium har uppnåtts.  $T_{1/2}$  kan användas för att beräkna lämplig dos och dosintervall vid upprepade administreringar när  $C_{max}$  och den önskade plasmakoncentrationen är känd. Koncentrationen vid steady state,  $C_{ss}$ , uppnås när tillförseln av läkemedel är ungefär lika stor som elimineringen, vilket sker efter ca 4 – 5 halveringstider. När steady state har uppnåtts kommer koncentrationen fluktuera i samma koncentrationsintervall efter varje administrering av läkemedel och hur stor denna fluktuation blir beror på hur doseringsintervallet. Medelkoncentrationen kommer alltså vara konstant mellan dosintervallen. Om administreringen fördelas på fler tillfällen kommer fluktuationerna bli mindre och tvärt om. Fluktuationerna kommer pendla mellan den högsta koncentrationen som benämns  $C_{max}$  och den lägsta koncentrationen,  $C_{min}$ .  $C_{max}$  är generellt den högsta koncentrationen av en viss dos av ett läkemedel som uppnås i plasma efter att de administreras och tiden till  $C_{max}$  benämns  $T_{max}$ .  $T_{1/2}$  kan alltså användas för att beräkna vilken dosering och doseringsintervall som ger ackumulering av läkemedel i kroppen (Rang *et al.*, 2016; Fan & de Lannoy, 2014; Toutain & Bousquet-Mélou, 2004b).

## Farmakodynamik

Farmakodynamik (PD) är läran om vilka effekter ett läkemedel har på kroppen (läkemedels-respons). Responsen påverkas av läkemedlets farmakokinetik och av verkningsmekanismer i målvävnaderna. Förhållandet mellan dos, plasmakoncentration och respons är centralt inom farmakodynamiken, alltså vilken effekt som fås vid en viss koncentration av läkemedlet i blodplasma. Läkemedel utövar effekt genom att på olika sätt binda in till proteiner i kroppen, till exempel enzymer, receptorer eller DNA. Målproteinets funktion stimuleras om läkemedlet är en agonist och hämmas om läkemedlet är en antagonist. Ett läkemedel kan vara en fullständig eller partiell agonist/antagonist. En full agonist/antagonist binder fullständigt till målproteinets funktion, vilket gör att den konkurrerar ut den endogena substansen. En partiell agonist/antagonist konkurrerar om målproteinets funktion med den endogena substansen. Effekten av läkemedlet ökar om dosen höjs men i många fall finns en gräns där systemet blir mättat, till exempel om alla målreceptorer blir uppbundna och då ger inte doshöjning en högre effekt (Rang *et al.*, 2016; Gad, 2007; Toutain & Lees, 2004; Ford, 2000).

Egenskaperna skiljer sig mellan olika läkemedel, dels på grund av att de binder till olika målproteiner men också på grund av att de binder på olika sätt. Ett läkemedels egen effekt (engelska: *efficacy*) ( $E_{max}$ ) är ett läkemedels maximala effekt, när ett maximalt antal målproteiner är bundna. Ett läkemedels potens anges av dess  $EC_{50}$ -värde vilket är den koncentration av läkemedlet som behövs för att uppnå 50 % av  $E_{max}$ . Ett lågt  $EC_{50}$  innebär att läkemedlet har en hög potens eftersom en liten koncentration läkemedel behövs för att ge halva maximala effekten. Om ett läkemedel har en hämmande effekt används istället benämningarna



$IC_{50}$  och  $I_{max}$ , vilket är den koncentration som krävs för att halvera den maximala aktiviteten av den endogena processen som läkemedlet påverkar och den maximala hämningen (Rang *et al.*, 2016; Gad, 2007; Toutain & Lees, 2004; Ford, 2000).

Mellan den lägsta koncentration av ett läkemedel som bör finnas i vävnaden för att det ska ha effekt och den högsta koncentration av läkemedlet som kan finnas innan biverkningarna blir oacceptabelt höga i förhållande till de positiva effekterna finns det "terapeutiska fönstret". Vid upprepad administrering av läkemedel är det önskvärt att koncentrationen finns i det terapeutiska fönstret så stor del av tiden som möjligt inom ett dosintervall och det är beroende av läkemedlets eliminering från kroppen samt den administrerade dosen. Vid ett brett terapeutiskt fönster kan läkemedlet administreras i större dos och mer sällan, medan vid ett litet fönster kommer läkemedlet behöva administreras ofta och i en lägre dos (Rang *et al.*, 2016; Gad, 2007; Toutain & Lees, 2004; Ford, 2000).

## **Atropin**

### ***Allmänna effekter i kroppen***

Atropin är i de beredningar som finns i dag ett 50/50 racemat med en L- och D-enantiomer där L-enantiomeren är biologiskt aktiv. L- och D-formen kan bindas ihop av sulfat och då bildas saltet atropinsulfat. Atropin kan då verka som en muskarinreceptorantagonist och har därför så kallade antikolinerga effekter. Muskarinreceptorer är G-proteinlänkade receptorer som finns i det parasympatiska nervsystemet i olika vävnader där de bland annat stimulerar kontraktion i glattmuskulatur. Atropin är en fullständig antagonist av acetylcholinets infästning på muskarinreceptorerna. Detta inhiberar den parasympatiska effekten på framförallt glattmuskulatur, hjärtmuskeln och CNS (Sjaastad *et al.*, 2016; Scott, 2014; Fryer *et al.*, 2012; Mughannam *et al.*, 1999; Ehlert *et al.*, 1997).

Andra vävnader där muskarinreceptorer finns representerade är gastrointestinalkanalen, vissa blodkärl, luftförande delar av lungorna, uterus och urinblåsan. Muscarinreceptorerna delas upp i fem subtyper:  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$ ,  $M_4$  och  $M_5$ . Alla subtyperna har acetylcholin som neurotransmittor vilket föranleder att de effekter som orsakas vid receptoraktivering benämns som kolinerga.  $M_1$ -receptorerna återfinns i CNS där de verkar hämmande på excitatoriska neuron, i parietal-celler i magsäcken där de stimulerar till ökad mängd magsyra vid vaguspåslag och perifer neuron.  $M_2$ -receptorerna återfinns framförallt i hjärtat, där de ansvarar för den vagala inhiberingen av hjärtmuskulaturen, och i gastrointestinalkanalen där de stimulerar kontraktion av glattmuskulatur och samverkar med  $M_3$ -receptorerna.  $M_3$ -receptorer finns i irissfinktern, ciliarmuskulaturen och i gastrointestinalkanalen där de stimulerar kontraktion samt exokrin sekretion.  $M_3$ -receptorer finns även i vissa kärl där de medierar avslappning av glattmuskulatur.  $M_4$ - och  $M_5$ -receptorer finns i CNS men deras funktion är inte klarlagd (Rang *et al.*, 2016; Fryer *et al.*, 2012; Ehlert *et al.*, 1997).

Irissfinktern, som är parasympatiskt innerverad, styrs av muskarinreceptorer medan dilator-muskeln i iris är sympatiskt innerverad. Den antikolinerga egenskapen hos atropin ger mydriasis och hämmar spasmen i ciliarmuskulaturen genom att blockera  $M_3$ -receptorn så att

kontraktionen av irissfinktern hämmas. Dilatormuskeln verkar då utan att bromsas av sfinktermuskulaturen och pupillen dilaterar (Gilger, 2017; Mughannam *et al.*, 1999).

### ***Atropin som behandling av uveit***

Atropin används ofta som behandling av uveit. Mios hos hästar med uveit gör att kammarvätskan hindras från att elimineras från kammarvinkeln på ett normalt sätt. Atropin som inducerar mydriasis tros öka tillgängligheten till iridocorneala vinkeln så att kammarvätskan enklare elimineras. Dessutom komprimeras blodkärlen i iris vid dilatationen vilket hämmar läckaget av inflammatoriska mediatorer från dessa samtidigt som permeabiliteten i endotelet i de uveala kärlen minskar generellt, vilket har en stabiliserande effekt på blod-ögon-barriären. Vid topikal administrering med atropinsulfat (1 %) i ögat hos en frisk häst uppnås dilatation av pupillen efter 45 minuter och maximal dilatation uppnås efter ca 10 – 48 timmar. Pupillen kan kvarstå dilaterad i mer än 14 dagar efter en engångsbehandling (Dalín, 2014; Maggs, 2009; Davis *et al.*, 2003; Mughannam *et al.*, 1999; Gelatt, 1995).

I dagsläget är den rekommenderade dosen en droppe atropinsulfat (1 %) topikalt var sjätte timme tills pupillen är maxdilaterad och därefter med ett dosintervall på ca 12 – 24 h (Gilger, 2017; Gilger & Michau, 2004).

### ***Atropins påverkan på tarmen***

Atropin hämmar den parasympatiska stimulanzen som ger kontraktion i tarmens glattmuskulatur, genom att som antagonist på muskarinreceptorn verka antikolinergiskt på de excitatoriska neuronerna i ENS. I motsats till detta har administration av acetylcholin visats stimulera den excitatoriska neuronerna i jejunum hos människa och därmed stimulera till kontraktion (Blikslager, 2017; Rang *et al.*, 2016; Rang, 1967).

Intravenös administrering av atropin har gett hämmande effekt på tarmens myoelektriska aktivitet hos häst i flera studier, baserat på mätning av olika biomarkörer. Det har beskrivits att grovtarmens myoelektriska aktivitet upphör under 30 minuter efter en intravenös engångsdos på 100 µg/kg (Ruckebusch *et al.*, 1986). Minskad elektrisk potential i tarmväggen i samband med intravenös administration av atropinsulfat i dosen 44 µg/kg har uppmätts med hjälp av elektroder i form av kirurgiska implantat på jejunum och flexura pelvina (Adams *et al.*, 1984). Ducharme och Fubini (1983) administrerade atropinsulfat i doserna 44 µg/kg och 176 µg/kg intravenöst vid olika tillfällen och utvärderade tarmmotiliteten genom auskultation av tarmljud istället för myoelektrisk potential. Båda doserna inducerade upphörda tarmljud efter 30 minuter och en häst som fått den lägre dosen utvecklade koliksymptom medan två hästar som fått den högre dosen fick kolik.

Atropin kan även ge nedsatt tarmmotilitet vid topikal administrering i ögat med kort dosintervall. Williams *et al.* (2000) administrerade sex hästar med 1 mg atropinsulfat topikalt i ett öga varje timma i 24 timmar. Tarmljuden var inte auskulterbare i någon av de fyra kvadranterna vid något tillfälle hos samtliga hästar mellan 2 – 18 h efter administreringen av atropinsulfatet. Fyra av de sex hästarna fick också koliksymptom. I den studien erhöll även fem

hästar en engångsdos med atropin 3 mg subkonjunktivalt i ett öga där tre av hästarna fick upphörda tarmljud och en av hästarna visade koliksymptom (Williams *et al.*, 2000).

Även vid längre dosintervall kan motiliteten påverkas. Vid tre timmars doseringsintervall med 1 % atropin 0,1 mL (motsvarande 1 mg atropinsulfat och 0,835 mg atropin) topikalt i ett öga påverkades tarmmotiliteten i studien av Ström (2014). Hästarna fick inte koliksymptom men tarmljuden minskade signifikant. Vid sex timmars doseringsintervall med en droppe 1 % atropin topikalt i ett öga påverkades inte tarmmotiliteten signifikant (Ström L., 2014).

### **Farmakokinetiken för atropin**

Från ögat absorberas läkemedlet till blodet via tårkanalsystemet, episclera och konjunktivan. Kärnen i tårkanalsystemets slemhinna är fenestrerad vilket förenklar absorptionen till blodcirkulationen. Eventuellt överflöd av läkemedlet kan även nå nässlemhinnan via tårkanalen i mediala ögonvinkeln, där det också kan absorberas över slemhinnan till blodet (Johansson, 2016: se Mealey, 2000; Bartlett, 1984).

Upptaget efter topikal administrering kan påverkas negativt av blinkningar och reflektorisk tårproduktion. Blinkningar medför att topikala läkemedel får en förkortad lokal effektduration eftersom läkemedlet sköljs bort från ögat och via tårkanalssystemet absorberas via nässlemhinnan. Själva vävnaderna i adnexan är relativt enkla för ett läkemedel att passera men tårfilmen är en skyddsbarriär som försvårar (Johansson, 2016: se Bartlett, 1984).

Biotillgängligheten för atropin efter topikal administrering av atropinsulfat varierar mellan individer. Hög biotillgänglighet med en median på 75 % har demonstrerats, men med en stor individuell variation (34 – 168 %, värdet på 168 % är troligen orsakat av icke korrekt skattning av farmakologisk distribution i kroppen vid beräkning av AUC) (Johansson, 2016). Liknande resultat har presenterats efter en motsvarande studie på humansidan av Kaila *et al.* (1999) där biotillgängligheten var 19 – 95 % med ett medelvärde på 64 % efter topikal administrering av atropin.

I examensarbetet av Johansson C (2016) var  $C_{max}$  för atropin hos häst, som tidigare nämnt, i median 75 % av administrerad dos och  $T_{max}$  var 13 minuter (variation 6 – 15 minuter) vid topikal administrering.  $T_{1/2}$  för atropin i blodet är signifikant kortare hos häst än hos människa och elimineringen från kroppen verkar gå snabbare hos häst efter intravenös administrering jämfört med topikal.  $T_{1/2}$  var i median 59 minuter (variation 36 – 95 minuter) vid topikal administrering och 45 minuter (variation 25 – 61 minuter) vid intravenös administrering, vilket är ca en tredjedel av  $T_{1/2}$  på människa (Johansson, 2016). Metabolismen av atropin sker i levern och  $T_{1/2}$  i blodet är 2 – 3 timmar hos människor. Av atropinet utsöndras 30 – 50 % i oförändrad form via urinen (Plumb, 2011; Kaila *et al.*, 1999).

### **Användning av elektointestinografi (EIG) till häst**

Tarmens motilitet hos hästar har i flera studier uppskattats med både invasiva och icke-invasiva metoder där den elektriska potentialen mäts.

Exempel på invasiva metoder är elektroder som kirurgiskt placerats på önskade tarmavsnitts serosa (Koenig & Cote, 2006) och tryckmätare i lumen (Sasaki & Yoshihara, 1999). Eftersom tarmens muskelaktivitet starkt korrelerar till den myoelektriska aktiviteten verkar elektriska potentialer vara ett användbart verktyg för att uppskatta tarmens motilitet (Blikslager, 2017). Dataanalyser av detta anses vara pålitliga (Lester, 1990).

Elektrointestinografi (EIG) är en icke-invasiv metod där elektroderna istället placeras på huden på hästens bukvägg. EIG har i flera studier använts för att mäta förändringar i tarmens myoelektriska aktivitet. De tarmsegment som ska undersökas lokaliseras med ultraljud och det är fördelaktigt att välja segment som har en konstant position, så som caecum och colon. Jejunums slyngor är mer mobila i buken och riskerar att flyttas ur position under mätningen (Koenig *et al.*, 2008; Sasaki, 2004; Sasaki *et al.*, 1998).

I en studie av Sasaki *et al.* (1998) jämfördes en invasiv och en icke invasiv metod. Resultat från elektroder som invasivt suturerats fast på caecums serosa ("Strain gauge transducers") jämfördes med elektroder fästa på huden i området över caecum (ECG, "electrocaecography"). Sex hästar injicerades med xylazine iv vilket minskade den myoelektriska aktiviteten i caecum. Skillnaden detekterades av båda metoderna och ECG ansågs som ett välfungerande och mer praktiskt alternativ till den mer invasiva metoden med inopererade elektroder.

EIG-mätningar av caecum och colon har även använts för att uppskatta tarmmotiliteten (Koenig *et al.*, 2008). Medianen av den myoelektriska aktiviteten i caecum och colon mättes med EIG efter administration med tarmmotilitetshämmande läkemedel (detomidin), tarmmotilitetsstimulerande läkemedel (erytromycin lactobionat) samt placebo. Resultatet från studien demonstrerade att EIG kan användas för att mäta den myoelektriska aktiviteten i caecum och colon. Dock behövs det enligt Koenig *et al.* (2008) flertalet elektroder med flera kanaler (en kanal är skillnaden mellan den aktiva elektroden och referenselektroden, som mäter spänningen och leder detta till förstärkaren) för att analysen ska bli pålitlig. Analyserna gav inga signifikanta skillnader i antalet cykler av aktivitet per minut men signifikanta skillnader i den myoelektriska potentialen i caecum och colon kunde mätas. Dock drogs slutsatsen att ultraljudet gav den säkraste uppskattningen av colons och caecums motilitet när det gäller cykler per minut och att EIG bör användas i kombination med andra diagnostiska tekniker.

EIG-metoden har också utvärderats av Sasaki (2004) där EIG-elektroder placerades på huden i området för tunntarm, cecum, högra ventrala och högra dorsala colon på sju friska fullblod som fodrades två gånger per dag. EIG-mätningarna genomfördes med tiominutersintervall under 24 h och resultaten utvärderades med löpande spektralanalys för att visuellt kunna se skillnaderna i kraften från EIG-mätningarna. Det visades vara optimalt att mäta tarmens elektriska potential med 6 cykler per minut (cpm), då 3 cpm gav för stor påverkan av artefakter medan alltför höga cpm - 9 cpm och mer - gjorde att förändringarna vid fodring inte blev synliga. I de tarmsegment som mätningen utfördes på mättes signifikant ökning av maximal amplitud och kraft av EIG:n under 1 – 4 h efter fodring. EIG bedömdes i denna studie som en lämplig icke-invasiv metod för att utvärdera den gastrointestinala funktionen hos hästar i klinisk verksamhet.

## Farmakologisk modellering i mjukvaran Monolix©Lixoft

Farmakokinetiska (PK) och farmakodynamiska (PD) studier kan beskriva varför det finns skillnader mellan individer i läkemedels exponering och respons i förhållande till en viss dos. PK-modeller används för att beskriva läkemedlets koncentration i förhållande till tid. Vid uppbyggnad av PK-modeller bör så kallade ”kompartments” tas i beaktning. Kompartments är en icke anatomisk indelning av kroppen. Denna indelning är beroende av hur många olika hastighetsförlopp som ett läkemedel uppvisar när koncentrationen mäts i blodplasma efter administrering. Indirekt är det ett mått ett läkemedels kinetik i olika vävnader i kroppen samt om det sprids till mer oåtkomliga delar som till exempel fettväv. Hos däggdjur är exempel på kompartments en viss del av kroppen så som blod eller extravaskulär vätska, men det kan även vara mer abstrakta mönster som inte representerar en viss del av kroppen. Dessa uppmärksammas som en del av analysen (Bon *et al.*, 2018; Mould & Upton, 2013).

Vid PK/PD-modeller innefattas även ett läkemedels effekter och en funktion för koncentration-effekt tas fram. Den största effekten av läkemedlet sker ibland samtidigt som högsta koncentration uppnås i blodet men ibland finns en lagg-fas där effekten inte följer samma mönster som koncentrationen. Detta kompenserar PK/PD-modellen för. Utformning av modeller genom PK/PD-analyser av läkemedels egenskaper är viktiga redskap vid läkemedels-utveckling (Mould & Upton, 2013).

Till exempel kan resultaten påverkas av individens ålder, kön, ras, grad av viss sjukdom eller påverkan av andra sjukdomsprocesser i kroppen. Detta kan beskrivas av ”Nonlinear mixed effects”-modeller (NLME) och i dessa modeller kan den individuella variationen uppskattas för respektive parameter (så kallad ”random effects”) eller använda specifika faktorer som ålder, kön och ras användas som kovariabler i analysen, istället för att sorteras bort som brus. Detta ger bättre slutsatser på populationsnivå. Dock finns godtyckliga fel, som inte kommer vara reproducerbara i en grupp med djur som har samma individuella avvikelse/egenskap, och dessa fel ska minimeras. Godtyckliga fel kan vara preanalytiska (fel vid administrering av läkemedlet till djuren), analytiska (problem med den analytiska metoden), eller postanalytiska (fel i hur modellen utformas). Dessa populationsanalyser är väletablerade inom humanfarmakologin men har på senare år även uppmärksammats inom veterinär farmakologi (Bon *et al.*, 2018; Pelligand *et al.*, 2016).

Monolix©Lixoft (Lixoft, Avignon, France) är en data-mjukvara som är designad för populationsanalyser (NLME-modeller) och den har använts i farmakologiska analyser som legat till grund för ansökningar till både europeiska (EMA) och amerikanska (FDA) läkemedelsmyndigheter (©Lixoft, 2018). Genom PK/PD-modellering går det att fastställa dels läkemedlets omsättning (halveringstid etc.) och även hur hög koncentration som krävs i blodet för att hämma tarmens rörelser och orsaka kolik. De resultaten tillsammans med äldre kunskaper om hur mycket atropin som tas upp i blodcirkulationen efter ögonbehandling kan användas för att utvärdera vilka behandlingsprotokoll som ger minimal risk för kolik.

## MATERIAL OCH METODER

### Experimentella studier

#### *Djur i studien*

Hästarna i studien var 8 varmblodiga travhästar varav 3 valacker och 5 ston som ägs av Kliniska vetenskaper, Sveriges lantbruksuniversitet i Uppsala (Tabell 1). Hästarna är inte aktiva i träning och tävling.

Under försöken observerades hästarnas allmäntillstånd och symptom på kolik uppmärksamades. Det fanns även en plan för åtgärder vid eventuell kolik. Dessa observationer och plan för åtgärder var nödvändiga ur djurskyddssynpunkt.

Tabell 1. *Hästarna i studien och administrerad mängd atropinsulfat. 1 µg atropinsulfat motsvarar 0,835 µg atropin*

Hästummer	Kön	Vikt kg		Ålder år	Atropinsulfat µg/kg	Atropin µg/kg
		Atropin	Kontroll			
1	Valack	557	561	11	9	7,5
2	Sto	675	670	12	9	7,5
3	Valack	481	480	19	9	7,5
4	Sto	510	515	12	9	7,5
5	Valack	509	504	14	12	10
6	Sto	539	547	8	12	10
7	Sto	526	532	13	12	10
8	Sto	504	497	18	12	10

#### *Experimentell design*

Åtta hästar inkluderades i en randomiserad, blindad experimentell studie med cross-over design bestående av två behandlingar med konstantinfusion: i) atropinsulfat (Atropin Mylan 0,5 mg/mL, Mylan AB, Stockholm, Sverige) och ii) koksaltlösning som kontrollbehandling (Natriumklorid Fresenius Kabi 9 mg/mL, Fresenius Kabi AB, Halden, Norge). Båda behandlingarna administrerades som en konstantinfusion över 30 minuter. Försöket hade tillstånd från Uppsala Djurförsöksetiska nämnd.

Fyra av hästarna administrerades med atropinsulfat 9 µg/kg och fyra av hästarna 12 µg/kg (individuella doser återfinns i tabell 1.) där 1 µg atropinsulfat motsvarar 0,835 µg atropin. Atropinsulfatet administrerades genom infusion i 30 minuter. Upprepade blodprov, observationer av tarmmotiliteten (auskultation och elektointestinografi), kontinuerlig elektrokardiografi och övervakning av pupillstorlek samt hästarnas beteende med avseende på koliksymptom utfördes utefter ett på förhand fastställt provtagningsprotokoll under tio timmar.

Praktiska omständigheter under försöket orsakade 1 – 8 minuters förskjutning vid vissa mätningar, förseningar noterades och justerades för i dataanalysen.

Blodproven analyserades med avseende på plasmakoncentrationen av atropin och utifrån resultaten utfördes PK/PD-modellering i den kommersiellt tillgängliga mjukvaran Monolix©Lixoft 2018R2.

### *Protokoll*

Dagen innan försöksdagen klipptes hästarna i området för jugularvenerna (inför insättande av kanyl) och på höger buksida inför placering av EIG-elektroderna. På försöksdagen mättes hästarnas kroppstemperatur, de vägdes och en venkateter (14G \* 133 mm, HighFlow IV Cannula, PU, fioniavet, STERILE EO) placerades i jugularvenen på vardera sida och fixerades med tre suturer. Hästarna skrittades i skritmaskin (Prowalker 18-8, Innovation Sandviken, Sandviken Sverige) under 20 minuter på morgonen innan försöket och 20 minuter på kvällen efter försöket (hastighet 3, ca 9 km/h). Fönstren i hästarnas stall täcktes för att reducera distraktioner. Området över flanken tvättades och tarmsegmenten (colon och caecum) lokaliserades med ultraljud varpå elektroderna placerades på hästarna.

Atropin respektive koksalt infunderades med hjälp av en infusionspump (Volumat Agilia, Fresenius Kabi, Uppsala, Sverige) i den venkateter som var på hästens bortsida från boxdörren (olika sidor beroende på vilken box hästen stod i). Detta underlättade provtagningarna under försökets gång. Infusionen med atropin/placebo pågick under 30 minuter. När infusionen startades, startades även tiden i försökets 10 timmar. Blodprov erhöles från den kanyl som inte använts vid infusionen. Prover erhöles med täta intervall initialt och mer sällan de sista timmarna. Tidpunkterna var: 0 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 32 min, 35 min, 40 min, 45 min, 50 min, 60 min, 1 h 15 min, 1 h 30 min, 1 h 45 min, 2 h, 2 h 20 min, 2 h 40 min, 3 h, 3 h 30 min, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h, 10 h.

Under försökets 10 timmar hade hästarna fri tillgång till hösilage och vatten, kraftfoder utfodrades enligt respektive hästs ordinära foderstat.

### ***Undersökningar***

#### *Koncentration atropin i blodplasma*

Blodet samlades upp i EDTA-rör och kylades med is direkt efter provtagningen. Sedan centrifugerades (Centrifuge 5702, eppendorf) rören i 3000 g under 10 minuter varefter och EDTA-plasman överfördes till Eppendorfrör och frystes ned till -70°C i väntan på vidare kvantifiering av atropinkoncentrationen.

#### *Elektrointestinografi (EIG)*

Den elektriska potentialen registrerades med elektrointestinografi powerlab 8/35 år 2014 från AD Instruments med BioAmp FE 234 QuadAmp.

Området för caecum och colon lokaliserades på höger buksida med ett lågfrekvent 4 Hz från LOGIQ e Veterinary, GE Medical Systems och en konvex prob användes. Elektroder

placerades på hästarnas högra sida över området för tarmsegmenten. Före och under försökets gång mättes impedansen mellan elektroderna. Vid impedans över 5 kOhm byttes elektroden ut. Under försöket mättes tarmens myoelektriska potential med EIG under perioder om 5 minuter med som startades innan infusionen (nollmätning), 5 min, 20 min, 30 min, 45 min, 1 h, 1 h 15 min, 1 h 30 min, 1 h 45 min, 2 h, 2 h 15 min, 2 h 30 min, 2 h 45 min, 3 h, 3 h 15 min, 3 h 45 min, 4 h, 4 h 30 min, 5 h, 6 h, 7 h, 8 h, 9 h, 10 h.

De första 3 minuterna av varje 5-minutersmätning användes vid analysen av EIG-resultaten från både caecum och colon, förutom vissa specifika mätningar där rörelseartefakter gjorde det olämpligt att använda just den sekvensen då den innehöll störningar. Rådata bearbetades med en spektralanalys där kraften i signalen illustreras i ett spektrogram. Algoritmen "fast fourier transformation" användes för att överföra de värden som associerats med tid till energifrekvens. En power densitets-analys inom frekvensområdet 3 – 9 cpm (frekvens 0,05 – 0,15 Hz) tillämpades för att mäta kraften i de elektriska signalerna.

### *Koliksymptom/auskultation*

Hästarna observerades med avseende på koliksymptom och tidpunkter för träckavgång under studiens gång. Auskultation av tarmljud registrerades med fonendoskop över flankens fyra kvadranter (högt och lågt på höger respektive vänster buksida vid flanken) och tarmljuden graderades från 0 – 3 per kvadrant där 0 var avsaknad av tarmljud, 1 var sänkta tarmljud, 2 var normala tarmljud och 3 var förstärkta tarmljud. Resultaten från de fyra kvadranterna räknades sedan ihop till en totalpoäng. Tarmen auskultades vid givna tider: 0 min, 10 min, 30 min, 45 min, 1 h, 1 h 15 min, 1 h 30 min, 1 h 45 min, 2 h, 2 h 15 min, 2 h 30 min, 3 h, 3 h 15 min, 3 h 30 min, 3 h 45 min, 4 h, 4 h 30 min, 5 h, 6 h, 7 h, 8 h, 9 h, 10 h.

Koliksymptomen rangordnades med hjälp av en kolikskala modifierad från Sutton *et al.* (2013) som rangordnar graden av kolik från mild till grav med nummerskala 1 – 5.

- Grad 1 definieras som milda koliksymptom med att hästen blir inåtvänd, tittar sig mot flanken och trampar oroligt.
- Grad 2 definieras med att hästen förutom att se sig mot flanken och trampa oroligt också skrapar med hoven, sträcker ut buken, sparkar sig mot buken och blir rastlös.
- Grad 3 definieras med att hästen förutom att skrapa med hoven, sträcka ut buken, sparka sig mot buken och bli rastlös dessutom ligger ned på bröstet.
- Grad 4 definieras med att hästen förutom att ligga på bröstet också försöker lägga sig eller lägger och reser sig direkt samt att hästen ligger på sidan.
- Grad 5 definieras med de mest akuta koliksymptomen där hästen rullar sig, kastar sig på marken eller kollapsar (Sutton *et al.*, 2013).



### *Analysmetod för atropin i plasma*

Den kvantitativa analysen av atropin i EDTA-plasman utfördes med vätskekromatografi kopplad till tandem-masspektrometri (UHPLC-MS/MS) på Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA). LOQ (lägsta möjligt kvantifierbara koncentration) var 0,048 µg/L.

Till 100 µl plasma (kalibratorer, QC-prover eller studieprover) tillsattes 50 µl internstandard-lösning (<sup>2</sup>H<sub>5</sub>-atropin, 150 µg/L), följt av 100 µL iskall acetonitril. Provrören vortex-blandades i 10 minuter, varefter de centrifugerades i 10 minuter vid 11 500 g. En del av supernatanterna (50 µL) blandades med 100 µL vatten i injektionsvialer och injicerades (10 µL) i ett instrument av typen ultra-high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) (Acquity UPLC – TQS micro från Waters Corporation, Milford, MA, USA).

Jonisationstekniken var positiv elektropray. Den analytiska kolonnen var en Acquity UPLC BEH C18 (längd 100 mm; innerdiameter 2,1 mm; partikelstorlek 1,7 µm) tempererad till 60 °C. Mobila fasen bestod av (A) 10 mM ammoniumformat i vatten och (B) 0,1 % myrsyra i vatten. Elueringen utfördes enligt följande: initialt konstant vid 20 % B under 1,0 minut, linjär ökning till 90 % B under 1,0 minut, minskning till 20 % B under 0,1 minut och konstant vid 20 % B under 1,9 minuter. Flödeshastigheten var 200 µL/min. Elektrosprayspänningen var satt till 1,5 kV och konspänningen till 35 V. Desolverings- och sourceblockstemperaturerna var 350 respektive 150 °C och desolveringsgasflödet var 650 L/h.

Kvantifieringen av atropin utfördes i selective reaction monitoring mode (SRM) med kollisionscellen fylld med argon. Massövergångarna var  $m/z$  290 > 124 för atropin (kollisionsenergi 28 eV) och  $m/z$  295 > 124 för den interna standarden <sup>2</sup>H<sub>5</sub>-atropin (kollisionsenergi 28 eV). Uppehållstiden var 0,10 sekunder).

Referensstandarder för atropin och den interna standarden inköptes från Toronto Research Chemicals (North York, ON, Kanada). Kalibreringskurvorna konstruerades genom att avsätta kromatografisk toppareakvot (analyt/intern standard) som en funktion av analytkoncentrationen. Kalibreringsfunktionerna räknades ut genom linjär kurvanpassning med viktningsfaktorn  $1/x^2$ . Kalibreringsområdet var 0,05 – 500 µg/L plasma. Precisionen (relativa standardavvikelsen) var i intervallet 1,3 – 14,9 % och riktigheten var i intervallet 95,9 – 104 %.

### **Farmakokinetisk/farmakodynamisk (PK/PD) analys**

Farmakologiska analyser (så kallad PK/PD-modellering) av både atropin- och biomarkördata utfördes i den kommersiellt tillgängliga mjukvaran Monolix©Lixoft 2018R2 (Lixoft, Antony, Frankrike). En icke-linjär mixed effekt (NLME) trekompartmentsmodell anpassades till experimentella data (plasmakoncentrationer av atropin) baserat på *Akaike information criterion* (AIC) och inspektion av diagnostiska grafer. Modellparametrarna var Clearance ( $Cl$ ), volymen för respektive kompartiment 1, 2 och 3 ( $V_1$ ,  $V_2$  och  $V_3$ ) samt en parameter som beskriver distributionen mellan respektive kompartiment ( $Q_1$  och  $Q_2$ ). Den totala distributionsvolymen för atropin i populationen beräknades som  $V_d = V_1 + V_2 + V_3$ . Den effektiva halveringstiden vid steady state var  $V_{ss} = \ln(2) * V_d / Cl$ . Residualvariationen, alltså den del av variationen som inte kan beskrivas av dessa parametrar, togs fram. Baslinjen som modellens respons utgick från ( $E_0$ )

i EIG-datan för caecum respektive colon redovisades. Mellanindividvariation modellskattades för  $Cl$  och resterande variation i experimentella data summerades som residualvariationsmodell med en proportionerlig riktning i parametern. Plasmakoncentrations-tidskurvan kopplades sedan till en direkt hämning av EIG-aktiviteten enligt hämningsfunktionen  $I$ :

$$I = 1 - \frac{I_{max} \cdot C_p^n}{IC_{50}^n + C_p^n} \quad (4)$$

Där  $I_{max}$  är maximal hämning av den dosering som användes,  $C_p$  är plasmakoncentrationen av atropin,  $IC_{50}$  är plasmakoncentrationen vid 50 % av maximal respons och  $n$  är en parameter som beskriver lutningen på det sigmoidala koncentrations-respons sambandet.

Precisionen i analyserna definierades av CV %, vilket i optimala fall är lägre än 20 – 30 % vilket indikerar att modellens precision är relativt hög.

Bertand and Mentré (2008) har beskrivit de matematiska uttrycken mer utförligt i en utläggning kring matematiska uttryck som används i Monolix©Lixoft (Bertrand & France, 2008).

## Statistik

Statistiska analyser tillämpades för hypotesprövning om tarmens elektriska potentialer eller tarmljud skiljer sig efter behandling med atropin jämfört med placebo. Hypotesprövningen testade följande nollhypoteser: 1) behandling med atropin påverkade inte den myoelektriska potentialen eller produktionen av tarmljud, 2) det föreligger ingen skillnad mellan atropin och kontrollbehandling vid någon tidpunkt av försöket, och 3) det föreligger ingen skillnad mot preadministrationsvärdet i den myoelektriska potentialen eller produktionen av tarmljud.

Regressionsanalyser utfördes med hjälp av den statistiska mjukvaran Minitab© 18.1.0 (Minitab© LLC, State College, Pennsylvania, USA). Histogram över EIG-datan och auskultationsdatan togs fram. En generaliserad linjär modell utarbetades utifrån en regressionsanalys där EIG-datan från caecum och colon i behandlad grupp jämfördes med respektive kontrollgrupp vid de olika tidpunkterna. En regressionsanalys av auskultationspoängen för behandlad grupp och kontrollgrupp för respektive tidpunkt i experimentet utfördes också.

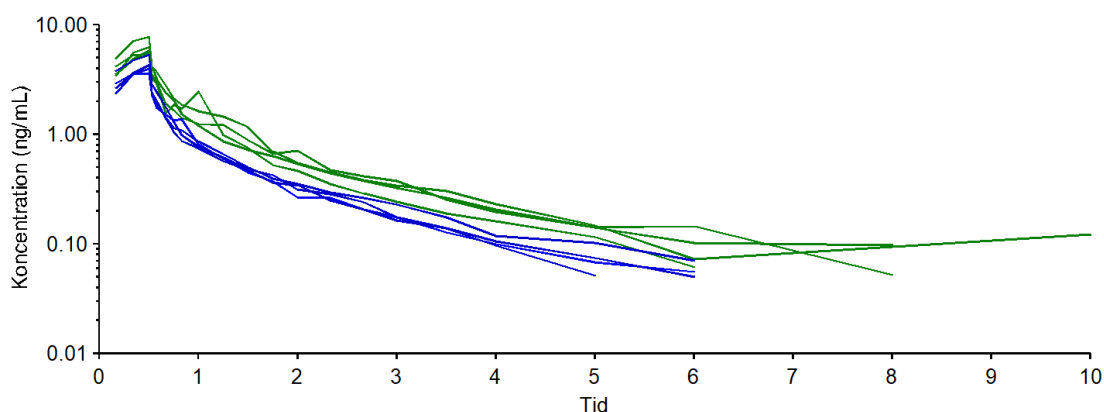
## RESULTAT

### Plasmaexponering av atropin

Plasmadispositionen av atropin karaktäriserades av en snabb initial fas, en intermediär fas och en långsammare terminal fas (Figur 1). Plasmakoncentrationerna var generellt högre efter administration av 12 µg/kg jämfört med 9 µg/kg från första mätning till dess koncentrationen sjunkit under LOQ (0,48 µg/L). Även högsta observerade plasmakoncentration var högre för de hästar till vilka 12 µg/kg atropinsulfat administrerats. Efter dosnormalisering överlappade koncentration-tidskurvorna för de två doseringsregimerna varandra.

Medelvärde var  $C_{max} = 6,3 \mu\text{g/L}$  hos hästar som administrerats  $12 \mu\text{g/kg}$  atropinsulfat. Hos hästar som administrerats  $9 \mu\text{g/kg}$  var medelvärde  $C_{max} = 4,2 \mu\text{g/L}$ .

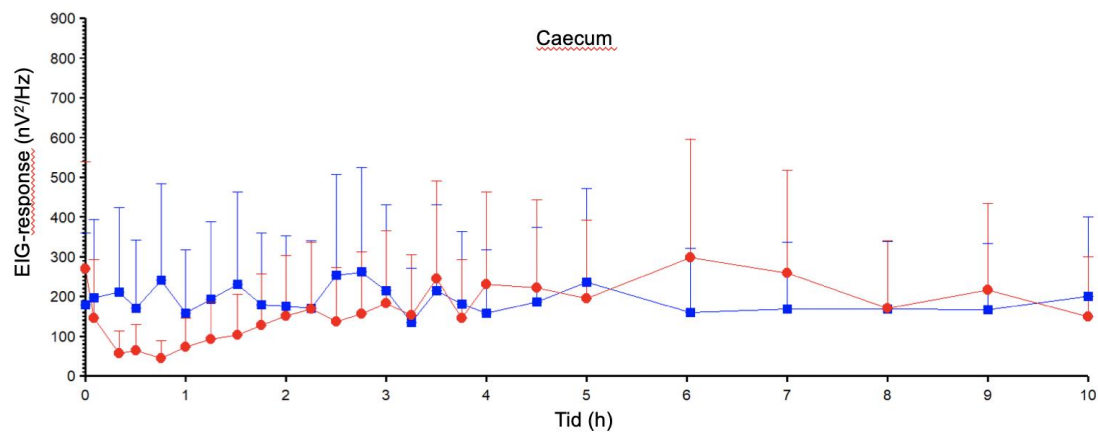
Efter administration av  $9 \mu\text{g/kg}$  atropinsulfat sjönk plasmakoncentrationen atropin under LOQ efter 5 h hos en häst och efter 6 h hos de resterande 3 hästarna. Efter administration av  $12 \mu\text{g/kg}$  atropinsulfat sjönk plasmakoncentrationen atropin under LOQ efter 6 h hos en häst och efter 8 h hos två hästar.



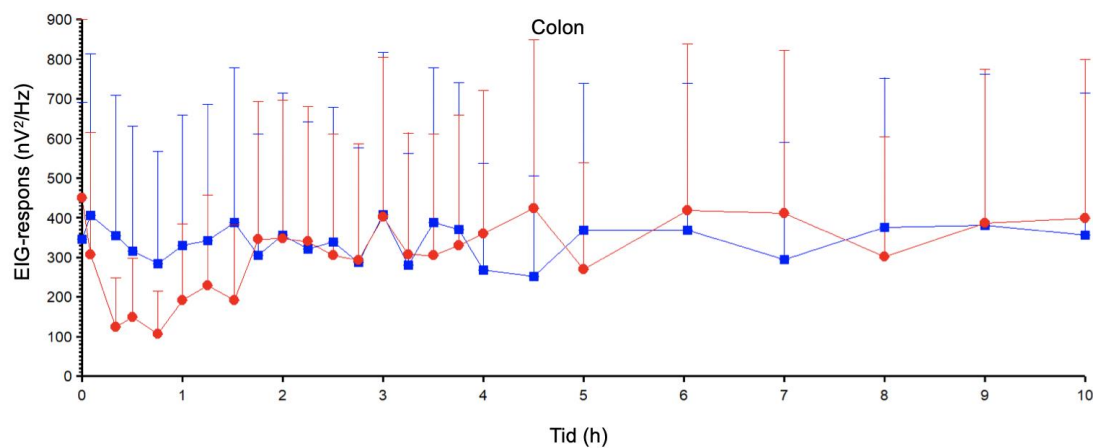
Figur 1. Spagettiplot över individuella plasmakoncentrations-tidskurvor under och efter en 30 minuter lång konstantinfusion av atropinsulfat i två olika doser: Blå linjer representerar koncentrations-tidskurvorna för dosen  $9 \mu\text{g/kg}$  och gröna linjer representerar dosen  $12 \mu\text{g/kg}$ .

### Biomarkörer över tid

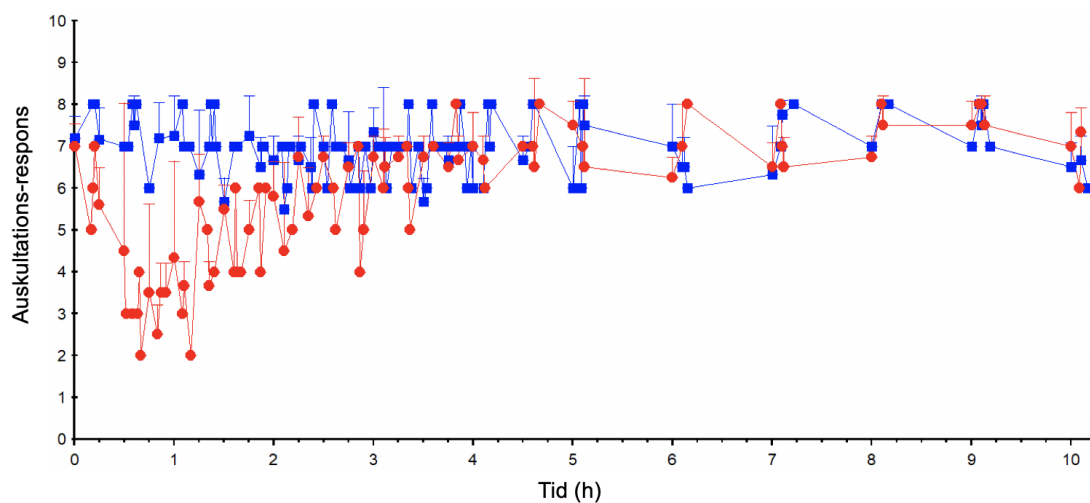
Mätningarna av tarmens elektiska potentialer för caecum (Figur 2) och colon (Figur 3) karaktäriseras av en variation både inom individ över tid och mellan registreringar samt mellan individer. Auskultationspoängen (Figur 4), varierade också mellan och inom individer. Både EIG-potentialerna och auskultationspoängen reducerades dock under och efter infusionen med atropinsulfat och uppvisade liknande förlopp över tid. EIG-potentialerna i caecum var signifikant (Tabell 2) lägre mellan 20 minuter - 3 h samt vid tidpunkterna 3 h 45 minuter och 10 h efter att infusionen med atropinsulfat startats jämfört med kontrollbehandling. För colon förelåg en sänkning av EIG-potentialerna mellan 20 minuter - 1 h och vid 1,5 h efter att infusionen startats, jämfört med kontrollbehandling (Tabell 2). Auskultationspoängen i omgången när hästarna erhållit atropinsulfat blev signifikant (Tabell 3) lägre inom 15 minuter - 2 h och vid tiden 2 h 45 min efter att infusionen startats jämfört med kontrollomgången.



Figur 2. Spagetti plot över medelvärde för myoelektriska potentialer i caecum uppmätta med EIG mot tid under och efter en 30 minuter lång konstantinfusion med atropinsulfat (röda punkter) och koksaltlösning (blå kvadrater). Standardavvikelse vid respektive mätning visas som vertikala linjer.



Figur 3. Spagetti plot över medelvärde för myoelektriska potentialer i colon uppmätta med EIG mot tid under och efter en 30 minuter lång konstantinfusion med atropinsulfat (röda punkter) och koksaltlösning (blå kvadrater). Standardavvikelse vid respektive mätning visas som vertikala linjer.



Figur 4. Spagetti plot över individuella auskultationspoäng-tidskurvor under och efter en 30 minuter lång infusion med atropinsulfat (röd linje) och koksaltlösning (blå linje). Y-axelns värden är en summering av auskultationspoäng från bukens fyra kvadrater från varje auskultationstillfälle.

Tabell 2. Signifikanta *p*-värden ( $p < 0,05$ ) för sänkning av *EIG*-potentialer i colon och caecum efter infusion med atropinsulfat jämfört med natriumkloridlösning vid respektive tidpunkt. Vid ”-” och övriga tidpunkter fanns ingen signifikant sänkning av *EIG*-potentialerna ( $p > 0,05$ )

Tidpunkt	p-värde caecum	p-värde colon
20 min	0,000	0,008
30 min	0,000	0,015
45 min	0,000	0,007
1 h	0,001	0,048
1 h 15 min	0,001	-
1 h 30 min	0,003	0,024
1 h 45 min	0,007	-
2 h	0,026	-
2 h 30 min	0,023	-
3 h 15 min	0,020	-
10 h	0,030	-

Tabell 3. Signifikanta *p*-värden ( $p < 0,05$ ) för sänkning av auskultationspoäng efter infusion med atropinsulfat jämfört med natriumkloridlösning vid respektive tidpunkt

Tidpunkt	p-värde auskultationspoäng
15 min	0,010
30 min	0,000
45 min	0,000
1 h	0,000
1 h 15 min	0,000
1 h 30 min	0,000
1 h 45 min	0,000
2 h	0,000
2 h 45 min	0,012

### **Koliksymptom**

Efter behandling med atropinsulfat uppvisade sex av åtta hästar koliksymptom vid något tillfälle, medan en av åtta hästar uppvisade koliksymptom efter behandling med koksaltlösning (Tabell 4).

Tabell 4. Kolikobservationer under och efter en 30 minuter lång konstantinfusion med atropinsulfat och i ett fall koksaltlösning ("Dos atropinsulfat 0 µg/kg")

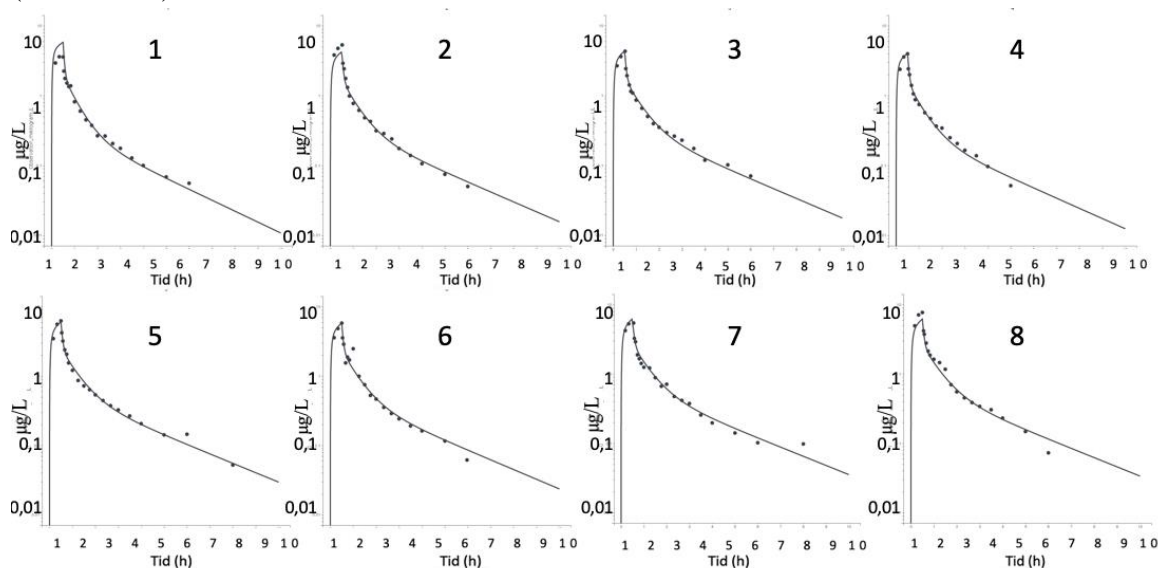
Häst-ID	Grad kolik	Symptom tidsperiod (minuter)	Längd tidsperiod (minuter)	Auskultationspoäng (respektive mätning under tidsperiod)	Dos atropinsulfat
1	1	30 - 105	75	3, 2, 3, 5, 5	9 µg/kg
2	1	52 - 81	29	3, 4, 4	9 µg/kg
5	1	15 - 55	40	5, 2, 3	12 µg/kg
6	1	15 - 60	45	5, 2, 2, 3	12 µg/kg
7	1	39 - 98	59	4, 4, 4, 4, 4	12 µg/kg
8	1	32, 83*	2	7, 7	0 µg/kg
8	1	15 - 52	37	5, 3, 4	12 µg/kg

\*) Häst 8 uppvisade under kontrollomgången milda koliksymptom vid två separata tidpunkter och inte under en tidsperiod.

## Farmakokinetisk modellering

Trekompartmentmodellen beskrev tillfredställande koncentration-tidsförloppet för atropin hos samtliga åtta hästar (Figur 5). De farmakologiska parametrarna som redovisade populationens medelvärde, *typical values* (CV %) var 2,1 L/h/kg (5,96 %), 0,349 L/kg (10,3 %), 1,53 L/kg (11,2 %) samt 0,704 L/kg (14,6 %) för  $Cl$  respektive  $V_1$ ,  $V_2$  och  $V_3$ . Den totala distributionsvolymen för atropin i populationen var  $V_d = V_1 + V_2 + V_3 = 0,349 + 1,53 + 0,704 = 2,58$  L/kg. Populationens  $Q_1$  och  $Q_2$  var 0,776 L/h/kg respektive 2,17 L/h/kg. Residualvariationen (CV %) var 0,134 L/kg (4,41 %).

Den effektiva halveringstiden vid steady state var  $V_{ss} = \ln(2) * V_d / Cl = \ln(2) * 2,58 / 2,1 = 0,85$  h (51 minuter).

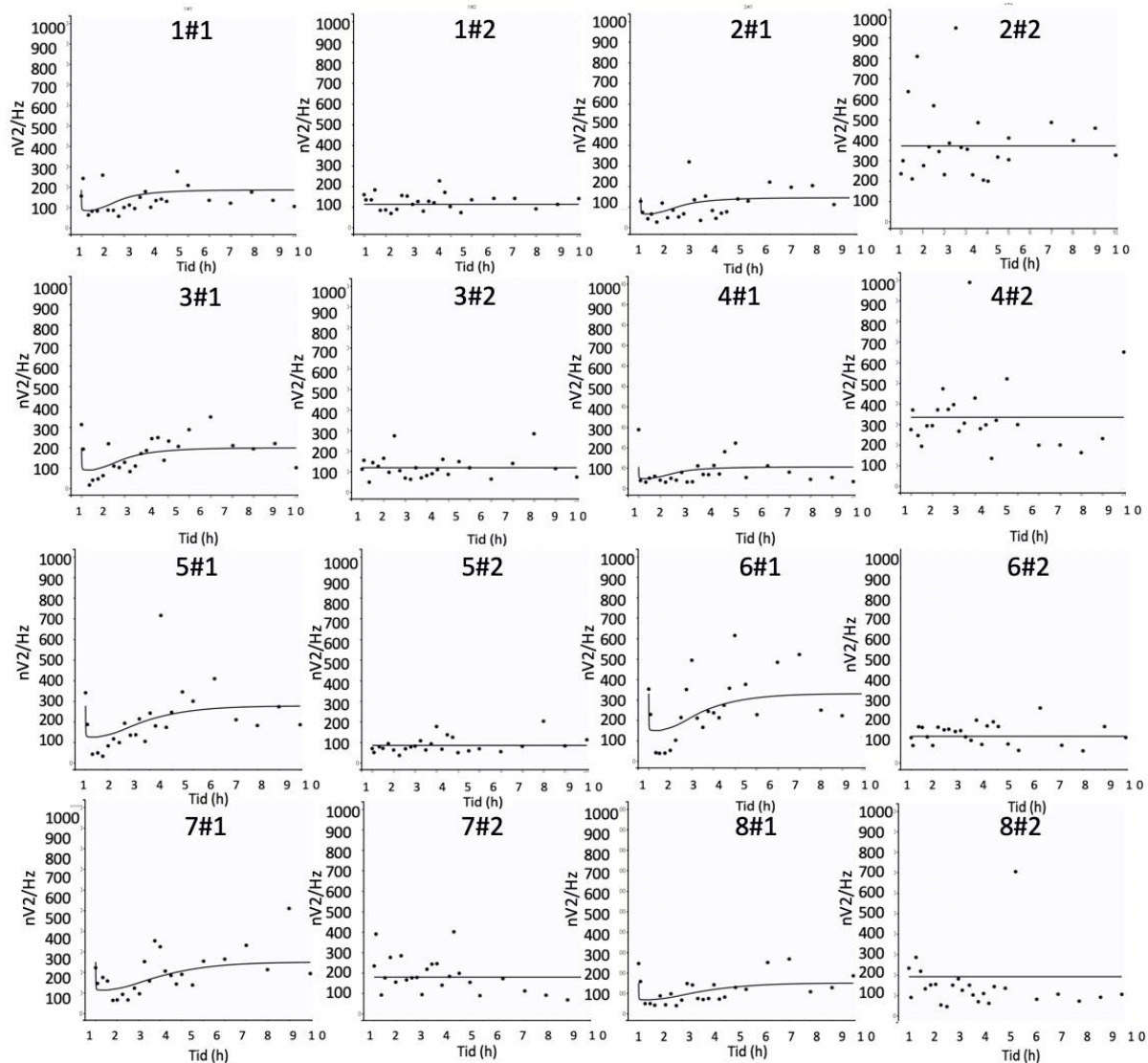


Figur 5. Observerade (symboler) och modellanpassade (linjer) atropin plasmakoncentration-tidskurvor efter administration av 9 µg/L (häst 1 – 4) eller 12 µg/L (häst 5 – 8) atropinsulfat som en intravenös konstantinfusion över 30 minuter.

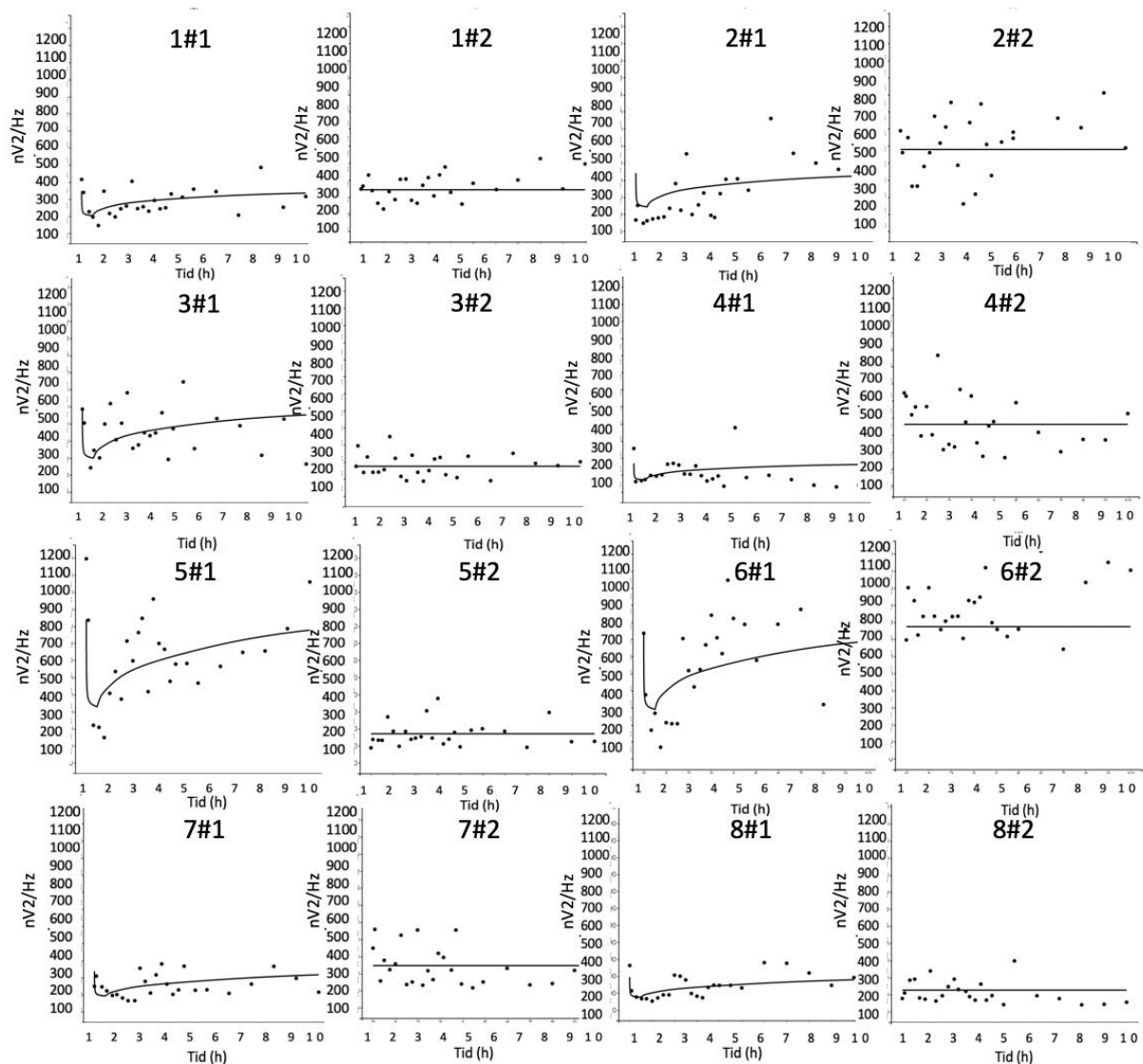
## Farmakodynamisk modellering

EIG-responsen uppvisade stor variabilitet inom och mellan individer för både caecum och colon (Figur 6 och 7). Dynamikmodellen speglade sänkningen i EIG-aktivitet väl hos samtliga hästar.

Parametervärdena visade en opåverkad baslinje med relativt hög precision efter att hästarna erhållit koksaltlösning (Figur 6 och 7, 1-8#2), med CV % på 11,7 % för caecum och 18,0 % för colon. Efter administration med atropinsulfat sjönk EIG-potentialerna i förhållande till baslinjen i modellen. Hämmningen av EIG-potentialer, *typical values* (CV %), var 55,8 % (11,6 %) och 74 % (77,1 %) i caecum respektive colon. Hälften av den maximala hämmningen i caecum uppnåddes vid koncentrationen ( $IC_{50}$ ), *typical values* (CV %), var 0,343  $\mu\text{g/L}$  (24,7 %), 0,59  $\mu\text{g/L}$  (182 %) för caecum respektive colon. Den sigmoidala lutningen  $n$  (CV %) var 0,44 (18,2 %) och 0,577 (18,1) för caecum respektive colon. Responsens baslinje för EIG-datan  $E_0$  (CV %) var 183 nV2/Hz (11,7 %) och 309 nV2/Hz (18 %) för caecum respektive colon.



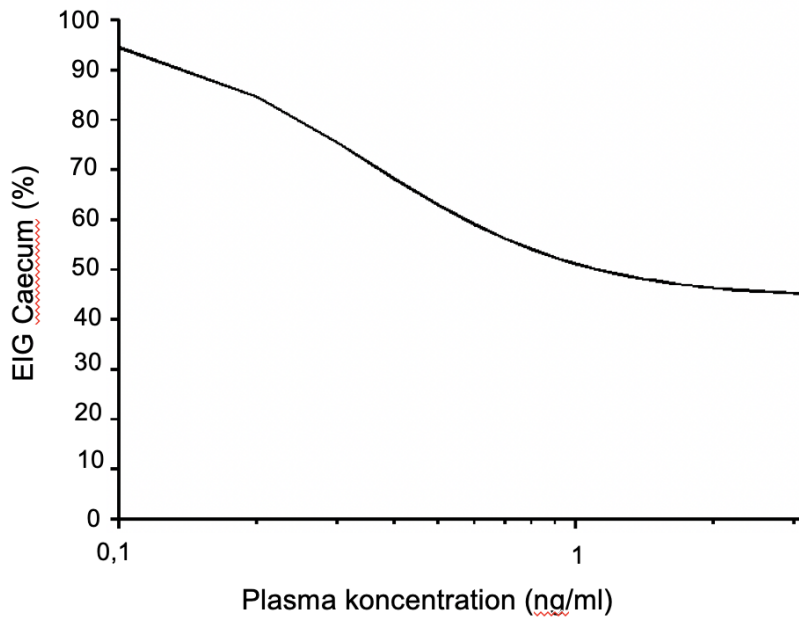
Figur 6. Observerade (symboler) och modellanpassade (linjer) EIG-data från caecum över tid för åtta hästar under och efter en konstantinfusion av atropin (1-8#1) alternativt koksaltlösning över 30 minuter (1-8#2).



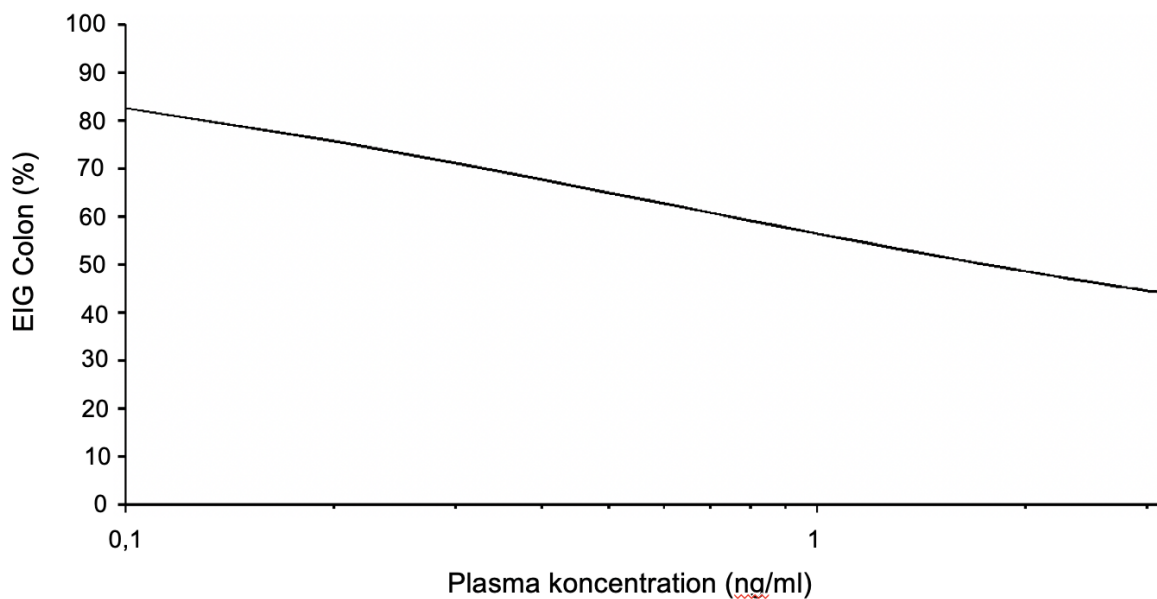
Figur 7. Observerade (symboler) och modellanpassade (liner) EIG-data från colon över tid för åtta hästar under och efter en konstantinfusion av atropin (1-9#1) alternativt koksaltlösning över 30 minuter (1-8#2).

Simuleringar över sambandet mellan plasmakoncentration-respons (fraktionell hämning) visar att vid atropinkoncentrationer under  $0,1 \mu\text{g/L}$  påverkas EIG-potentialerna i mycket liten utsträckning i både caecum och colon (Figur 8 och 9). Den huvudsakliga hämningen av EIG-potentialerna sker i koncentrationsintervallet  $0,1 - 1 \mu\text{g/L}$ . I det intervallet ger en liten förändring i koncentration relativt stor förändring i respons avseende hämning av EIG-potentialer. Vid koncentrationer över  $1 \mu\text{g/L}$  krävs en större förändring i koncentration för att orsaka en i jämförelse mindre förändring i responsen. Den maximala hämningen ( $I_{max}$ ) enligt denna modell utifrån doserna i detta experiment var 56 % för caecum och 74 % för colon. Simuleringarna är baserade på de farmakodynamiska parametrarna genererade i dessa experiment vilka är framtagna baserade på den plasmaexponering de relativt låga doserna medförde. Den maximala hämningen av den elektriska potentialen ( $I_{max}$ ) kan således förväntas vara större vid högre plasmaexponering (doser).





Figur 8. Simulering av den fraktionella hämningen av EIG-potentialer för caecum (y-axel) i förhållande till plasmakoncentration atropin (x-axel). Ej fullständig hämning av tarmen till följd av försiktig dosering med atropinsulfatet med tanke på kolikrisken hos hästarna. På y-axeln avser 100 % baslinjevärdet för EIG-potentialer i caecum.



Figur 9. Simulering av fraktionell hämning av EIG-potentialer för colon (y-axel) i förhållande till plasmakoncentration atropin (x-axel). Ej fullständig hämning av tarmen till följd av försiktig dosering med atropinsulfatet med tanke på kolikrisken hos hästarna. På y-axeln avser 100 % baslinjevärdet för EIG-potentialer i colon.

## DISKUSSION

### Plasmaexponering av atropin

Förloppet för atropin över tid karaktäriserades av tre faser vilka talar för att atropin fördelas i tre uppskattade kompartments i kroppen. Medelvärde för  $C_{max}$  hos de två grupperna (9 µg/kg och 12 µg/kg) var som förväntat högst i den grupp som erhållit högsta dosen. Det fanns en variation för  $C_{max}$  mellan individer, men dessa värden överlappade inte varandra i de två grupperna. Att plasmakoncentrationerna från de två doseringsregimerna överlappar varandra efter dosnormalisering indikerar linjär kinetik inom det studerade koncentrationsintervallet. Den mellanindividuella variationen för  $C_{max}$ , där olika plasmakoncentrationer uppnås trots samma dosering av läkemedlet, beror sannolikt på variationer i individernas kinetik av läkemedlet. Kinetikanalysen var dock robust där de modellpredikterade plasmakoncentrationen av atropin följer den observerade experimentella datan väl. Ökningen av atropinkoncentration i blodet verkade proportionell i förhållande till dosökningen.

### Biomarkörer över tid

#### *EIG-potentialer över tid*

EIG-datan uppvisade stor variabilitet både inom och mellan individer – både inom och mellan olika försöksomgångar. Tarmens EIG-potentialer verkar alltså i normalfallet vara dynamiska och variera kraftigt. Detta beror sannolikt på att tarmens myoelektriska aktivitet bland annat anpassas efter den ingesta och gas som för tillfället finns i tarmen. Eftersom ingesta i olika mängd ständigt passerar hos hästar är det rimligt att den elektriska potentialen varierar därefter (Blikslager, 2017; Koenig & Cote, 2006). Det var tydligt att atropin hämmade dessa dynamiska EIG-potentialer. EIG-potentialerna blev lägre inom 20 minuter – 3 h i caecum och inom 20 minuter – 1 h i colon efter att infusionen med atropinsulfat startats, vilket väl följer den högsta exponeringen av atropin (Figur 1 och 2). Dessutom blev oscillationerna på kurvan inom individer mindre under denna period samt att variabiliteten mellan individer blev betydligt mindre, indikerat av standardavvikelserna (Figur 2 och 3).

Eftersom EIG-potentialerna var sänkta kortare tid i colon jämfört med caecum indikerar detta att de myoelektriska potentialerna i colon inte är lika känsliga för inverkan av atropin som i caecum. Detta kan jämföras med en studie av Mitchell *et al.* (2005) där motiliteten i caecum och colon utvärderades med ultraljud. Motiliteten i caecum hämmades i större utsträckning av svält respektive exponering för xylazin, jämfört med motiliteten i colon. Författarna föreslog att detta skulle kunna bero på att caecum har snabbare passage och mindre komplexa motilitetsmönster än colon (Mitchell *et al.*, 2005). Dessutom var  $IC_{50}$ -värdet för atropin lägre för caecum än colon, alltså är atropin mer potent i att hämma caecums myoelektriska aktivitet vilket i den här studien användes som surrogat för motilitet. Caecum verkar alltså vara känsligare än colon för hämning av atropinexponering.

Den statistiska signifikansen visades med p-värden  $< 0,05$  vilket det var under de tidsperioder när tarmen signifikant hämmades, vilket sammanföll med höga plasmakoncentrationer atropin. Det fanns dock avvikande p-värden som visade signifikant sänkning av EIG-potentialer vid 3 h 15 minuter och vid 10 h för caecum samt vid 1 h 30 minuter för colon vilket inte var lika

förväntat då doserna atropin i blodet var låga vid dessa tidpunkter. Den statistiska modell som användes tog heller inte hänsyn till att det finns en viss korrelation mellan p-värden eftersom samma individ provtogs upprepade gånger. Den starka signifikansen (låga p-värden) i början av observationsperioden när plasmakoncentrationen av atropin var som högst tillsammans med de liknande tidsförloppen och tydliga skillnaderna mellan aktiv behandling och kontrollbehandling för samtliga tre biomarkörer är övertygande i att atropinexponering orsakade en verklig sänkning av tarmmotiliteten.

### ***Auskultationsdata över tid***

Tarmljuden vid auskultation graderas hos en häst med normala tarmljud till 2 per kvadrant, totalpoängen blir då 8 då fyra kvadranter undersöks. Friska hästar kan ha nedsatta tarmljud vissa tider på dygnet (Blikslager, 2017) och även under kontrollbehandlingen hade hästarna vid vissa tidpunkter tarmljud poäng 1 i tarmljud i en eller flera av bukens fyra kvadranter (se figur 4). Dock var tarmljuden starkt signifikant sänkta inom 15 minuter – 2 h efter att infusionen med atropinsulfat administrerats i den behandlade gruppen. Samtliga hästar hade totalpoäng på 5 och lägre någon gång under denna tidsperiod, vilket innebär auskultationspoäng 1 eller lägre i tre av bukens fyra kvadranter och 2 eller lägre i en av bukens fyra kvadranter. Fyra av hästarna hade auskultationspoäng 0, alltså helt tyst buk, vid vissa tidpunkter under denna tidsperiod. Kliniskt är en tyst buk en viktig variabel som indikerar tarmlidande (Blikslager, 2017).

Sänkningen av auskultationspoäng korrelerade överlag väl med tidsperioden för sänkta EIG-potentialer för både caecum och colon. Dock varierade tidsperioden för sänkningen av EIG-potentialerna, vilka var signifikant sänkta en timma längre i caecum och en timma kortare i colon jämfört med den signifikanta sänkningen av auskultationspoängen.

Sänkningen av tarmljud var starkt signifikant med låga p-värden  $< 0,000$  mellan 30 minuter och 2 h i under behandling med atropinsulfat jämfört med kontrollbehandling. Vid tiden 2 h 45 minuter fanns en signifikant sänkning av tarmljud som inte var förväntad då det fanns tidpunkter med icke signifikant sänkning efter 2 h. Detta kan bero på slumpmässiga fel i sannolikhetsfördelningen, likt de avvikelser som noterades vid analys av signifikans för sänkning av EIG-potentialer.

### ***Kolikdata över tid***

Koliksymptom noterades hos i störst utsträckning bland de hästar som behandlats med den högsta dosen atropin (12  $\mu\text{g/kg}$ ) där samtliga fyra hästar uppvisade milda koliksymptom. Av de hästar som behandlats med den lägre dosen (9  $\mu\text{g/kg}$ ) noterades koliksymptom hos två av hästarna. Dessa data är baserade på en liten grupp individer och få observationer vilket gör att de inte är direkt överförbara till populationsnivå. Dock är det rimligt att fler hästar i gruppen som fått högre dos atropinsulfat får koliksymptom i högre utsträckning eftersom det är känt att atropin hämmar tarmens motilitet och att smärta ofta uppstår vid inducerat sänkt motilitet. Koliksymptom observerades också hos en av hästarna som inte behandlats med atropin. Dessa symtom noterades vid två separata tillfällen och var inte kontinuerliga under en tidsperiod, vilket de var hos de hästarna som behandlats med atropin. Erfarenhetsmässigt liknar milda koliksymptom generella beteenden (till exempel skrapandes med hoven) som hästar utför när

de är uttråkade eller frustrerade, vilket gör att det kan vara svårt att skilja mild kolik från allmän frustration. Sannolikt hade denna häst inte verklig kolik utan visade dessa beteenden av annan anledning. Att milda koliksymtom är svåra att skilja från frustrationsbeteenden bör tas i beaktning när resultaten för övriga hästar tolkas. Dock sågs en markant ökning i frustrationsbeteenden hos de hästar som erhöll atropin jämfört med kontrollbehandling. Koliksymptomen sammanföll dessutom med sänkt tarmmotilitet och hög atropinexponering och detta stärker att hästarna faktiskt hade kolik vid dessa observationer.

Tidsperioden för tarmens sänkning av EIG-potentialer och auskultationspoäng korrelerar väl med tidsperioden där sex av hästarna som erhållit atropin uppvisade koliksymtom, vilket var vid tillfällena mellan 29 min och 1 h 15 min. Dock var variationen i EIG-potentialerna stor och det fanns tillfällen då vissa hästar, både inom den behandlade gruppen och kontrollgruppen, hade samma eller lägre EIG-potentialer än vad respektive häst hade vid en förmodad kolikepisod. Varför en häst kan ha uppskattningsvis lägre tarmmotilitet (utifrån EIG-potentialerna) än vid en kolikepisod men ändå inte uppvisa koliksymtom skulle kunna bero på att tarmens myoelektriska potentialer är dynamiska och därför möjligtvis är anpassningsbara efter vilken mängd ingesta och gas som för tillfället finns i tarmen. Detta skulle hypotetiskt kunna leda till att smärta uppstår när en sänkning av motiliteten induceras med exempelvis atropin, när tarmen egentligen skulle behöva vara aktiv och arbeta med ingestan, men inte när tarmen självmant sänker aktiviteten för att behovet av motilitet är sänkt.

### **Farmakodynamisk/farmakokinetisk modellering**

I den farmakokinetiska modellen varierade flödet av atropin från blodplasman till vävnaderna, vilket gjorde att lutningen på kurvan atropinkoncentration i blod-tid inte var samma i de tre faserna, trots att  $V_d$  och  $Cl$  i själva verket är konstanta.

Det var tydligt utifrån modellen hos varje enskild individ att EIG-potentialerna sänktes efter atropininfusionen både i caecum och colon jämfört med baslinjen. Parametrarna var välbestämda för caecum och acceptabla för colon. Modellens  $I_{max}$  för caecum var välbestämd med lågt CV %-värde (11,6 %) medan precisionen för samma modell för colon hade högre CV %-värde (77,1 %) vilket talar för att det var svårare att skatta värdena i colon då skillnaderna i EIG-potentialerna var mindre där jämfört med caecum.

Atropins potens var, enligt modellen, nästan dubbelt så hög i caecum som i colon eftersom nästan halva mängden atropinsulfat krävdes för att hämma caecum (0,343  $\mu\text{g/L}$ ) jämfört med colon (0,59  $\mu\text{g/L}$ ). Dock indikerar CV %-värdet att  $IC_{50}$ -värdet var betydligt mer välbestämt för caecum (24,7 %) jämfört med colon (182 %), alltså kan detta parametervärde variera kraftigt för colon. Höga CV% gör att tillförlitligheten för modellens parametrar blir sämre men modellparametrarna kan ändå användas som ett riktvärde för hur atropin påverkar colon i populationen.

Vid högre doser antas egeneffekten ( $I_{max}$ ) på tarmen skulle bli större men av säkerhet- och djuretiska skäl testades inte högre doser då syftet var att bestämma ett  $IC_{50}$ -värde, inte orsaka svår kolik och ileus.

## Klinisk relevans

Dosen atropinsulfat som administreras i ögat vid en ögonbehandling beror på koncentration och volym på ögondropparna. Detta är en viktig aspekt för att en kliniker ska veta vilken mängd som administreras. Ändå verkar detta skilja sig mellan olika tillverkare av ögondroppar och informationen kring detta är tvetydig. Exempel på två olika sorters ögondroppar som innehåller atropinsulfat och som används till häst i Sverige är Atropin Bausch & Lomb Ögondroppar och Isopto®-Atropin Ögondroppar. Enligt FASS-texten under fliken ”Dosering” innehåller Atropin Bausch & Lomb Ögondroppar, lösning i endosbehållare 1 % (10 mg/mL), en droppe ca 0,3 mg atropinsulfat om medföljande pipett används. I samma FASS-text, under fliken ”Överdosing”, anges att 3 droppar av en 1 %-ig lösning är 1,5 mg atropinsulfat. Enligt detta skulle i sådana fall en droppe innehålla 0,5 mg atropinsulfat vilket skiljer sig från det som tidigare anges för samma läkemedel (FASS, 2019). I fass-texten för Isopto®-Atropin Ögondroppar, lösning 1 %, framgår inte hur mycket atropinsulfat en droppe innehåller under fliken ”Dosering”. Däremot finns samma information under fliken ”Överdosing”; att 3 droppar innehåller 1,5 mg atropinsulfat (FASS, 2018). För att säkra doseringen av ögondropparna skulle lösningen kunna dras upp i sprutor istället för att använda medföljande pipetter eller droppa på fri hand. Om behandlingsriktlinjer i framtiden ska kunna tillämpas kliniskt förutsätts att korrekt dos kan administreras.

Vid antagande att en droppe Atropinsulfat 1 %-ig lösning från någon av dessa tillverkare innehöll 0,5 mg atropinsulfat skulle en droppe q 6 h, enligt rekommenderad dos från Gilger och Michau (2004) motsvara en dygnsdos på 2 mg. På en 500 kg häst skulle detta motsvara en dos på 4 µg per kg och dag. Om biotillgängligheten antogs vara 75 % vid topikal administrering skulle den upptagna dosen till blodet bli 3 µg per kg och dag (Gilger, 2017; Johansson, 2016; Gilger & Michau, 2004).

Vid administrering med 1 mg atropinsulfat (motsvarande 0,835 mg atropin) topikalt i ögat på 6 hästar resulterade detta i en  $C_{max}$  (median-värde) på 0,375 µg/L (Johansson, 2016) Vid behandling med ögondroppar med max 0,5 mg/droppe (FASS, 2019; FASS, 2018) skulle  $C_{max}$  bli  $\frac{0,375}{2} = 0,19$  µg/L. Teoretiskt uppnås alltså inte  $IC_{50}$ -värdet för caecum och colon (0,343 - 0,59 µg/L) vid normal behandling av uveit av en 500 kg häst. Dessutom uppnås  $C_{ss}$  efter 4 - 5 halveringstider och för att ackumulering ska uppstå bör läkemedlet administreras åter inom denna tidsperiod (Rang *et al.*, 2016; Fan & de Lannoy, 2014; Toutain & Bousquet-Mélou, 2004b). Halveringstiden för atropin vid topikal administrering är i median 59 minuter (36 – 95 minuter) (Johansson, 2016) och vid normal behandling av uveit, var sjätte timma, kommer plasmakoncentrationerna med atropin hållas låga och inte ackumuleras så tarmens motilitet borde inte påverkas nämnvärt. I studien av Williams *et al.* (2000) där atropinet administrerades varje timma uppstod därför sannolikt ackumulering av atropin i blodet vilket framkallade kolik hos hästarna (Williams *et al.*, 2000). Vid administrering var tredje timma hämmades tarmljuden eftersom atropinet sannolikt ackumulerades i blodet, så att tarmens motilitet hämmades konstant utan att kunna återhämta sig (Ström L., 2014). Detta indikerar också att den terapeutiska dosen i dagsläget används vid uveit hos häst inte ger ökad risk för kolik, eftersom  $IC_{50}$ -värdet ej uppnås och läkemedlet inte kan ackumuleras då doseringsintervallet är så långt. En liten häst, upp till ca 250 kg, skulle kunna nå  $IC_{50}$ -värdet för caecum (0,343 µg/L) efter att

en droppe atropinsulfat (0,5 mg) administreras eftersom en hälften så stor häst kommer få ca dubbla  $C_{max}$ . Dock är halveringstiden så kort att det vid dosering var sjätte timma inte borde hämma tarmen tillräckligt för att ge kolik.

I andra studier där hästarna efter administration av atropin fått upphörd tarmmotilitet och koliksymtom har betydligt högre doser administrerats än i den här studien. De 9 respektive 12  $\mu\text{g/kg}$  som hästarna erhöll i dessa experiment kan jämföras med 44  $\mu\text{g/kg}$  respektive 176  $\mu\text{g/kg}$  som administrerades intravenöst i studien av Durcharme et. Fubini (1983). Om den upptagna dygnsdosen atropin vid behandling av uveit är 3  $\mu\text{g/kg}$  (75 % av 4  $\mu\text{g/kg}$ ) är doserna i den studien 14,7 respektive 58,7 gånger högre och då fick hästarna koliksymtom (Ducharme & Fubini, 1983). I studien av Ström (2014), där hästarna administrerades topikalt med 1 mg var 3:e timma och fick signifikant sänkta tarmljud, var den topikala dygnsdosen 8 mg per häst vilket motsvarar 16  $\mu\text{g/kg}$  för en 500 kg häst. Detta är 4 gånger den topikalt administrerade dosen vid behandlingen av uveit som beskrivs ovan och då minskade tarmljuden hos hästarna (Ström L., 2014). Eftersom plasmakoncentrationerna atropin inte blir så höga vid normal behandling av uveit, utan 1 mg ger  $C_{max}$  0,375  $\mu\text{g/L}$  (Johansson, 2016), borde inte dessa studier ligga till grund för att utesluta atropin som behandling av uveit utifrån risken för kolik som biverkning.

När istället 1 mg var sjätte timme administrerades av Ström (2014) uppmättes inte några signifikant sänkta tarmljud och detta är dubbel dos jämfört med den beskrivna uveitbehandlingen (Gilger, 2017; Ström *et al.*, 2014; Gilger & Michau, 2004). Under dessa studier har inte plasmakoncentrationerna med atropin mätts, men grovt kan dessa resultat indikera att kolik och påverkad tarmmotilitet verkar uppstå vid betydligt högre doser än den dos som används vid behandling av uveit.

I den formen av atropinsulfat som administrerades i detta experiment är 1  $\mu\text{g}$  atropinsulfat = 0,835  $\mu\text{g}$  atropin, alltså är det inte rent atropin. Endast hälften av detta är verksamt atropin då molekylen är ett 50/50 racemat när endast ena enantiomeren är biologiskt aktiv (Scott, 2014). Detta saknar klinisk betydelse i dagsläget då alla läkemedel innehållande atropinsulfat på svenska marknaden har denna sammansättning men är högst relevant om en annan sammansättning av atropin skulle framställas i framtiden.

Vid intensiva ögonbehandlingar av hästar finns andra faktorer än atropin som medför ökad risk för kolik. Minskad motion är en känd riskfaktor för kolik hos häst och hästar med akuta ögonsjukdomar rids och körs i normala fall inte. I många fall stallas de upp för att de inte ska utsättas för solljus när de har dilaterad pupill till följd av atropinet. Dessutom kan uppstallning på djursjukhus medföra ett foderbyte vilket också är en riskfaktor för kolik (Blikslager, 2017; Constable, 2017; Koenig & Cote, 2006; Cohen *et al.*, 1995). Dessa riskfaktorer borde åtgärdas i första hand vid rädsla för kolik, genom att handmotionera hästen under ögonbehandlingen och utföra successiva foderbyten om det är nödvändigt. Den motilitetshämmande effekten på tarmen från atropinet skulle sannolikt kunna förvärra en redan nedsatt tarmmotilitet och bidra till utveckling av kolik, exempelvis om hästen samtidigt utsätts för dåliga förutsättningar så som boxvila en längre period. Dock har troligtvis effekten av det sympatiska påslaget på grund av stark smärta från ögat vid irisspasm större negativ effekt på tarmen än de korta perioder av sänkt tarmmotilitet som uppstår efter administrering med atropin i glesa intervall.

## KONKLUSION

Ett  $IC_{50}$ -värde på 0,343  $\mu\text{g/L}$  för caecum och 0,59  $\mu\text{g/L}$  för colon konstaterades. Dessa plasmakoncentrationer uppnås teoretiskt inte vid normal behandling av uveit och doseringsintervallet är inte tillräckligt tätt för att ackumulering ska kunna uppstå. Detta indikerar att normal behandling av uveit inte ger ökad risk för kolik.

Sänkningen av EIG-potentialerna korrelerade väl med sänkningen av auskulterade tarmljud i dessa experiment. Att dessa metoder överensstämmer med varandra är värdefullt inför framtida studier av tarmmotilitet.

Tidigare studier där atropin administrerats intravenöst och topiskt har gett upphov till kolik och sänkt tarmmotilitet har betydligt högre doser använts än vid normal behandling av uveit. Dessa studier borde därför inte ligga till grund för att utesluta atropin som behandling vid uveit. Istället för att undvika atropin som behandling av uveit bör andra faktorer i hästens omgivning åtgärdas för att minska risken för kolik, till exempel bör hästen motioneras med täta intervall. Kolik hos hästar är allvarligt men att undvika atropin när det behövs kan ge allvarliga konsekvenser för hästens öga både på lång och kort sikt och detta övervägande bör underbyggas av relevant data. Resultaten i denna studie gör att det inte är motiverat att undvika atropin vid uveit hos häst.

## Tack

- Tack till handledare Carl Ekstrand och biträdande handledare Lena Ström, för erat viktiga stöd och handledning i uppsatsens teoretiska delar samt för introduktionen i er trevliga forskargrupp vid de praktiska experimenten
- Tack till examinator Eva Tyden
- Tack till Mikael Hedeland, för all hjälp med att författa metodbeskrivningen och den kvantitativa analysen av atropin i plasma
- Tack till Annika Källse och Peter Michanek för bra samarbete och vägledning vid de praktiska experimenten
- Tack till Mari Wallbring med personal i Kliniska vetenskapers stall för all hjälp med hästarna
- Tack till Ulf Emanuelsson och Jennifer Nyström för viktig hjälp med de statistiska beräkningarna
- Tack till finansiärerna av studien: Petra Lundbergs stiftelse och Svelands stiftelse för djurens hälsa och livskvalitet
- Slutligen tack till de tålmodiga hästarna Aslan, Antique, Mick, Wilma, Holger, Babe, Nice och Dina för era ädla insatser som kommer bidra till att bespara hästar från smärta och nedsatt syn

## POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING

Hästars ögon kan utsättas för en rad sjukdomar så som infektioner med virus, bakterier och parasiter men också genom trauman från omgivningen. I samband med detta utvecklar hästar ofta inflammation i ögat, uveit, som utgår från den så kallade druvhinnan (vilken iris, eller regnbågshinnan som är den färgade slutaren som omger pupillen, är en del av). Ett tecken på uveit är att pupillen drar ihop sig på ett krampaktigt sätt vilket i sig är smärtsamt och i värsta fall kan det leda till att den växer fast i detta läge vilket ger hästen nedsatt syn. Därför är inflammation i ögat är allvarligt – det kan leda till bestående nedsatt syn eller till och med blindhet. En viktig behandling av uveit är läkemedlet atropin som droppas i ögat. Detta verkar för att öppna upp pupillen innan den växer fast (Gilger, 2017; Schwink, 1992).

Läkemedlet atropin påverkar inte bara ögat utan även flera andra delar av kroppen. Bland annat kan atropin öka hjärtfrekvensen och sänka tarmens aktivitet. Hästar är särskilt känsliga för nedsatt aktivitet i tarmen eftersom detta kan leda till förstoppning, gasbildning eller andra smärtsamma tillstånd från buken som med ett samlingsnamn kallas kolik, vilket i allvarliga fall leder till döden. Det finns studier där hästar har fått nedsatt tarmaktivitet och kolik efter att atropin injicerats i blodet, men dessa doser har varit 4 – 44 gånger högre än den dos som normalt ges vid ögonbehandling (Menozzi *et al.*, 2017; Ström L., 2014; Williams *et al.*, 2000; Schwink, 1992; Adams *et al.*, 1984; Ducharme & Fubini, 1983). Dessa rön har lett till att vissa veterinärer undviker att behandla hästar med atropin vid ögonsjukdomar, vilket kan leda till att hästen upplever stark smärta från ögat och får permanent nedsatt syn. Drivkraften bakom detta examensarbete är att rädslan för atropins eventuella biverkningar är överdriven och en önskan kartlägga hur mycket atropin som krävs för att hästens tarm ska bli nedsatt. Detta för att i framtiden kunna fastställa hur mycket atropin som kan ges i ögat utan att hästen riskerar att drabbas av kolik.

I detta examensarbete tillfördes åtta hästar atropin i dropp en gång och koksaltlösning (placebo) i en så kallad kontrollbehandling. Hästarna fick två olika doser atropin, där den lägre dosen var 3 gånger högre än den dos som hästar teoretiskt får i blodet vid normal ögonbehandling. Den högre dosen var 4 gånger högre än vid normal ögonbehandling.

Hästarnas koncentration av atropin i blodet mättes under tio timmar efter att läkemedlet getts samtidigt som tarmens elektiska aktivitet mättes med så kallat EIG (elektrointestinografi). Dessutom lyssnade en veterinär på tarmljuden med stetoskop.

Samtliga hästarna i studien fick nedsatt elektrisk aktivitet i tarmen och nedsatta tarmljud efter att de fått atropin och detta skedde inom ungefär samma tidsintervall för alla hästar (de flesta inom de första två timmarna efter att de fått atropin). Detta kunde även bevisas med statistisk. Sex hästar fick mild kolik inom ca två timmar efter att de fått atropin, men koliken gick över snabbt – den längsta episoden av kolik varade 1 h 15 minuter. Eftersom koncentrationerna av atropin i blodet följdes gick det att konstatera att tarmens elektiska potential halverades vid en atropinkoncentration som var högre än den som uppnås vid behandling av uveit. Dessutom ges atropinet så sällan vid ögonbehandling att det inte kan ackumuleras i kroppen, vilket gör behandlingen ännu säkrare.



Resultatet från den här studien bekräftar att de olika undersökningarna, mätning av tarmens elektiska aktivitet (EIG) jämfört med när tarmljuden observeras med stetoskop, ger likvärdiga resultat. Dessutom visade hästarna endast milda koliksymptom, trots att de fick högre doser atropin än vid ögonbehandling. Hur olika koncentrationer atropin påverkar tarmen kunde kartläggas och de doser som används vid behandling av uveit är inte tillräckligt höga och ges inte tillräckligt ofta för att de ska kunna ge upphov till kolik. Istället för att undvika atropin som behandling av uveit bör andra faktorer i hästens omgivning åtgärdas för att minska risken för kolik, till exempel bör hästen motioneras med täta intervall. Kolik hos hästar är allvarligt men att undvika atropin när det behövs kan ge allvarliga konsekvenser för hästens öga både på lång och kort sikt och detta övervägande bör underbyggas av relevant data.

## REFERENSER

- Adams, S.B., Lamar, C.H. & Mast, J. (1984). Motility of the distal portion of the jejunum and pelvic flexure in ponies: effects of six drugs. *American Journal of Veterinary Research* 45(4), 795.
- Bartlett, J.D. & Cullen, A.P. (1984). Clinical administration of ocular drugs. In: Bartlett, J.D. & Janus, S.D. (Eds.), *Clinical Ocular Pharmacology*. Boston: Butterworth Publishers.
- Bertrand, J. & France, M. (2008). *Mathematical Expressions of the Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Models implemented in the Monolix software*. Paris Diderot University, Paris, France. [https://www.facm.ucl.ac.be/cooperation/Vietnam/WBI-Vietnam-October-2011/Modelling/Monolix32\\_PKPD\\_library.pdf](https://www.facm.ucl.ac.be/cooperation/Vietnam/WBI-Vietnam-October-2011/Modelling/Monolix32_PKPD_library.pdf)
- Blikslager, A.T., White, N.A., Moore, J.N. & Mair, T.S. (2017). *The Equine Acute Abdomen*. 3rd ed. Hoboken, New Jersey: Wiley Blackwell.
- Bon, C., Toutain, P.L., Concordet, D., Gehring, R., Martin-Jimenez, T., Smith, J., Pelligand, L., Martinez, M., Whitem, T., Riviere, J.E. & Mochel, J.P. (2018). Mathematical modeling and simulation in animal health. Part III: Using nonlinear mixed-effects to characterize and quantify variability in drug pharmacokinetics. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 41(2), 171-183.
- Castro, G.A. (1993). 1 - Immunological regulation of epithelial function. In: Walker, W.A., Harnatz, P.R. & Wershil, B.K. (Eds.), *Immunology of the Gut*. Academic Press.
- Cohen, N.D., Matejka, P.L., Honnas, C.M. & Hooper, R.N. (1995). Case-control study of the association between various management factors and development of colic in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association* (5), 667-673.
- Constable, P.D. (2017). *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs, and Goats*. 11<sup>th</sup> ed. St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Cooley, P.L. (1992). Normal equine ocular anatomy and eye examination. *The Veterinary clinics of North America. Equine Practice* (3), 427-449.
- Dalin, F. (2014). *Utvärdering av gastrointestinala effekter och koliksymptom vid ögonbehandling med höga doser atropin hos häst*. Sveriges lantbruksuniversitet. Veterinärprogrammet (Examensarbete 2014:15).
- Davis, J.L., Stewart, T., Brazik, E. & Gilger, B.C. (2003). The effect of topical administration of atropine sulfate on the normal equine pupil: influence of age, breed and gender. *Veterinary Ophthalmology* 6(4), 329-332.
- Ducharme, N.G. & Fubini, S.L. (1983). Gastrointestinal complications associated with the use of atropine in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 182(3), 229-231.
- Dyce, K.M., Sack, W.O. & Wensing, C.J.G. (2010). *Textbook of Veterinary Anatomy*. 4<sup>th</sup> ed. St. Louis, MO: Saunders Elsevier.
- Ehlert, F.J., Ostrom, R.S. & Sawyer, G.W. (1997). Subtypes of the muscarinic receptor in smooth muscle. *Life Sciences* 61(18), 1729-1740.
- Fan, J. & de Lannoy, I.A.M. (2014). Pharmacokinetics. *Biochemical Pharmacology* 87(1), 93-120.
- FASS (2019). *Isopto-Atropin*. Ögondroppar, lösning 1 %. [online] [Accessed 20191024].
- FASS (2019). *Atropin Bausch & Lomb*. Ögondroppar, lösning i endosbehållare 1 % (10 mg/ml). [online] [Accessed 20191023].

- Ford, G.A. (2000). Pharmacodynamics. In: Crome, P. & Ford, G.A. (Eds.), *Drugs and the Older Population*. London: Imperial College Press.
- Fryer, A.D., Christopoulos, A. & Nathanson, N.M. (2012). *Muscarinic Receptors (Handbook of Experimental Pharmacology 208)*. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Gad, S.C. (2007). *Preclinical Development Handbook: ADME and Biopharmaceutical Properties*. Wiley-Interscience.
- Gelatt, K.N., Gum, G.G. & MacKay, E.O. (1995). Evaluation of mydriatics in horses. *Veterinary & Comparative Ophthalmology* 5, 104-108.
- Gelatt, K.N. & Plummer, C.E. (2017). *Color Atlas of Veterinary Ophthalmology*. Chichester, UK: John Wiley & Sons.
- Gilger, B.C. (2017). *Equine Ophthalmology*. Chichester, UK: John Wiley & Sons.
- Gilger, B.C. & Michau, T.M. (2004). Equine recurrent uveitis: new methods of management. *Veterinary Clinics of North America-Equine Practice* 20(2), 417-+.
- Johansson, C. (2016). *Biotillgänglighet av atropin vid topikal ögonbehandling hos häst och metoder för objektiv mätning av tarmmotilitet*. Sveriges lantbruksuniversitet. Veterinärprogrammet (Examensarbete 2016:6).
- Kaila, T., Korte, J.M. & Saari, K.M. (1999). Systemic bioavailability of ocularly applied 1% atropine eyedrops. *Acta Ophthalmologica Scandinavica* 77(2), 193-196.
- Koenig, J. & Cote, N. (2006). Equine gastrointestinal motility - ileus and pharmacological modification. *Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne* 47(6), 551-559.
- Koenig, J.B., Martin, C.E.W., Nykamp, S.G. & Mintchev, M.P. (2008). Use of multichannel electrointestinography for noninvasive assessment of myoelectrical activity in the cecum and large colon of horses. *American Journal of Veterinary Research* 69(6), 709-715.
- Lavach, J.D. (1987). *The Handbook of Equine Ophthalmology*. 1<sup>st</sup> ed. Fort Collins, Colo: Giddings Studio.
- Lester, G.D. (1990). *The development and application of a computer system for the recording and analysis of intestinal myoelectrical activity in the horse*. Doctoral dissertation. Murdoch University, Perth, Australia.
- Maggs, D.J. (2009). Feline uveitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 11(3), 167-182.
- Mealey, K. (2000). Systemic absorption of topically administered drugs. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian*. 22(7), 649-657.
- Menozzi, A., Pozzoli, C., Poli, E., Bontempi, G., Serventi, P., Meucci, V., Intorre, L. & Bertini, S. (2017). Role of muscarinic receptors in the contraction of jejunal smooth muscle in the horse: An in vitro study. *Research in Veterinary Science* 115, 387-392.
- Mitchell, C.F., Malone, E.D., Sage, A.M. & Niksich, K. (2005). Evaluation of gastrointestinal activity patterns in healthy horses using B mode and Doppler ultrasonography. *Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne* 46(2), 134-140.
- Mould, D. & Upton, R. (2013). Basic concepts in population modeling, simulation, and model-based drug development - Part 2: Introduction to pharmacokinetic modeling methods. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology* 2(4), 1-14.

- Mughannam, A.J., Buyukmihci, N.C. & Kass, P.H. (1999). Effect of topical atropine on intraocular pressure and pupil diameter in the normal horse eye. *Veterinary Ophthalmology* 2(4), 213-215.
- Navarre, C.B. & Roussel, A.J. (1996). Gastrointestinal motility and disease in large animals. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 10(2), 51-59.
- Pelligand, L., Soubret, A., King, J.N., Elliott, J. & Mochel, J.P. (2016). Modeling of large pharmacokinetic data using nonlinear mixed-effects: A paradigm shift in veterinary pharmacology. A case study with robenacoxib in cats. *CPT - Pharmacometrics & Systems Pharmacology* 5(11), 625-635.
- Plumb, D.C. (2011). *Plumb's Veterinary Drug Handbook*. 7<sup>th</sup> ed. Stockholm, Hoboken, United States. Wiley-Blackwell.
- Rang, H.P. (1967). The pharmacology of intestinal smooth muscle. *The American Journal of Digestive Diseases* 12(3), 237-244.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J. & Henderson, G. (2016). *Rang and Dale's Pharmacology*. 8<sup>th</sup> ed. London: Churchill Livingstone.
- Ross, M.W., Cullen, K.K. & Rutkowski, J.A. (1990). Myoelectric activity of the ileum, cecum, and right ventral colon in ponies during interdigestive, nonfeeding, and digestive periods. *American Journal of Veterinary Research* 51, 561-566.
- Ruckebusch, Y., Bardon, T., Cherbut, C., Pairet, M. & Ferré, J.P. (1986). Smooth muscle pharmacology of the large intestine. In: Van Miert, A.S.J.P.A.M., Bogaert, M.G. & Debackere, M. (Eds.), *Comparative Veterinary Pharmacology, Toxicology and Therapy*. Proceedings of the 3rd Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology, August 25–29 1985, Ghent, Belgium Part II, Invited Lectures. pp. 123-132. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Sasaki, N., Lee, I., Ayukawa, Y. & Yamada, H. (2004). Clinical applications of electrointestinography in the horse. *Journal of Equine Science* 15 (4), 85-92.
- Sasaki, N., Mizuno, Y. & Yoshihara, T. (1998). The application of electroceography for evaluation of cecum motility in horses. *Journal of Veterinary Medical Science* 60(11), 1221-1226.
- Sasaki, N. & Yoshihara, T. (1999). The effect of motilin on the regulation mechanism of intestinal motility in conscious horses. *Journal of Veterinary Medical Science* 61(2), 167-170.
- Schwink, K.L. (1992). Equine uveitis. *Veterinary Clinics of North America-Equine Practice* 8(3), 557-574.
- Scott, A.L. (2014). Atropine. In: Wexler, P. (Editor-in-Chief), *Encyclopedia of Toxicology*, pp 339-341.
- Sjaastad, Ø.V., Hove, K. & Sand, O. (2016). *Physiology of Domestic Animals*. 3. ed. Oslo: Scandinavian Veterinary Press.
- Ström L., Dalin, F., Domberg M., Haubro Andersen P., Ekestén B. (2014). Topical ophthalmic atropine in horses – an experimental study. *Equine Veterinary Journal*, 46(S47):23. Proceedings of BEVA congress, Birmingham, England, 11-13 September, 2014. Uppsala, Sweden.
- Sutton, G.A., Dahan, R., Turner, D. & Paltiel, O. (2013). A behaviour-based pain scale for horses with acute colic: Scale construction. *The Veterinary Journal* 196(3), 394-401.
- SVS (2013). *Riktlinjer för användning av antibiotika inom hästsjukvård*. Sveriges veterinärmedicinska sällskap.

- Toutain, P.L. & Bousquet-Mélou, A. (2004a). Plasma clearance. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 27(6), 415-425.
- Toutain, P.L. & Bousquet-Mélou, A. (2004b). Plasma terminal half-life. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 27(6), 427-439.
- Toutain, P.L. & Bousquet-Mélou, A. (2004c). Volumes of distribution. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 27(6), 441-453.
- Toutain, P.L. & Lees, P. (2004). Integration and modelling of pharmacokinetic and pharmacodynamic data to optimize dosage regimens in veterinary medicine. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 27(6), 467-477.
- Wilkie, D.A. & Gilger, B.C. (2004). Equine glaucoma. *Veterinary Clinics of North America-Equine Practice* 20(2), 381-+.
- Williams, M.M., Spiess, B.M., Pascoe, P.J. & O' Grady, M. (2000). Systemic effects of topical and subconjunctival ophthalmic atropine in the horse. *Veterinary Ophthalmology* 3(2-3), 193-199.
- ©Lixoft, M. *Monolix Documentation*. [online] Available from: <http://monolix.lixoft.com>. [Accessed 20191022].